

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikka

2012

Saija Vahanne & Saana Viertomanner

# VIRIDANS-RYHMÄN STREPTOKOKKIKANTOJEN IDENTIFIOINTI BRUKERIN MALDI-TOF MS -LAITTEELLA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Saija Vahanne & Saana Viertomanner

## VIRIDANS-RYHMÄN STREPTOKOKKIKANTOJEN IDENTIFIOINTI BRUKERIN MALDI-TOF MS - LAITTEELLA

Viridans-ryhmän streptokokit ovat non- tai alfa-hemolyttisiä, pääosin matalavirulenssisia streptokokkeja, jotka voidaan jakaa viiteen ryhmään niille tyypillisten ominaisuuksien perusteella. Viridans-streptokokkien mitis-ryhmään kuuluva *Streptococcus pneumoniae* on tärkeä taudinaiheuttaja. Matriisiavusteista laserdesorptioionisaatio lentoaikamassaspektrometriaa (MALDI-TOF MS) käytetään mikrobien identifioimiseen, mutta sillä on ollut ongelmia viridans-streptokokkien identifioimisessa. MALDI-TOF MS:ssa mikrobisolun proteiinit ionisoidaan ja ionien massa erotellaan massa/varaus-suhteen ( $m/z$ ) perusteella lentoajan avulla ja näin saadaan molekyylin massaspektri. Mikrobille spesifistä spektriä verrataan viitetietokannassa olevien tunnettujen lajien spektreihin.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli identifioida viridans-ryhmän streptokokkeja käyttämällä Brukerin MALDI-TOF MS -laitetta ja verrata tyyppikannoista saatuja tuloksia niiden tyyppikantanimiin ja potilasnäytteiden tuloksia aiemmin pyrosekvenssoinnilla saatuihin tuloksiin. Tavoitteena oli selvittää voidaanko laitteella luotettavasti identifioida viridans-ryhmän streptokokit ja erottaa erityisesti pneumokokki muista viridans-streptokokeista.

Tutkimus suoritettiin TYKSLABin klinisen mikrobiologian laboratoriossa. Tutkimuksessa identifioitiin 154 näytettä, joista 55 oli tyyppikantakokoelmista kerättyjä ja 99 veriviljelynäytteistä eristettyjä bakteerikantoja. Kaikki näytteet identifioitiin MALDI-TOF MS:lla. Potilasnäytteistä saatuja tuloksia verrattiin niistä aiemmin pyrosekvenssoinnilla saatuihin tuloksiin ja tyyppikantanäytteistä saatuja tuloksia verrattiin niiden tyyppikantanimiin.

Sekä tyyppikanta- että potilasnäytteissä MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset täsmäsivät ryhmätasolla erittäin hyvin. Tyyppikantanäytteistä 91 %:sta saatiin lajitasolla oikea tulos ja potilasnäytteistä 36 %:sta saatiin pyrosekvenssoinnilla ja MALDI-TOF MS:lla sama laji. Lajitasolla väärin identifioiduista potilasnäytteistä suurin osa kuului mitis-ryhmään. MALDI-TOF MS tunnisti virheellisesti pneumokokeiksi 40 mitis-ryhmään kuuluvaa kantaa. Näin ollen laite ei sovellu pneumokokkien identifiointiin. Muiden viridans-ryhmän streptokokkien identifioinnin luotettavuus laitteella vaihtelee.

### ASIASANAT:

Streptokokki, viridans-ryhmän streptokokki, MALDI-TOF MS ja bakteeri-identifikaatio.

Saija Vahanne & Saana Viertomanner

## IDENTIFICATION OF VIRIDANS GROUP STREPTOCOCCI BY USING BRUKER'S MALDI- TOF MASS SPECTROMETER

Viridans group streptococci are non or alpha hemolytic gram positive bacteria with mainly low level of virulence and can be divided into five groups based on their typical characteristics. *Streptococcus pneumoniae* of the mitis group is an important pathogen. Matrix assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is used for identification of microbes, although it has succeeded variably in identifying viridans streptococci. MALDI-TOF MS first ionizes the microbe's proteins, then separates them according to their mass/charge (m/z) ratio and finally, with the help of their time-of-flight produces a mass spectrum for the molecule. The species specific spectrum is then compared to the spectra of known species in a database.

The aim of this study was to identify viridans group streptococci by using Bruker's MALDI-TOF mass spectrometer and to compare the results obtained from type strain isolates to their type strain names and the results from clinical isolates to the results previously obtained by pyrosequencing. The objective of the study was to investigate whether it is possible to identify viridans group streptococci reliably by using MALDI-TOF MS and more specifically if it can distinguish *S. pneumoniae* from other viridans streptococci.

The study was performed at the Clinical Microbiology Laboratory of TYKSLAB. Altogether 154 samples were analyzed, of which 55 were from type strain collections and 99 were bacterial strains isolated from blood cultures. All isolates were identified by using MALDI-TOF MS. The results were then compared to the type strain names and the results previously obtained from pyrosequencing.

Both type strain and clinical samples were identified successfully by MALDI-TOF MS at group-level. At species-level 91 % of type strains were identified correctly, but only 36 % of clinical samples were assigned to the same species as by pyrosequencing. Most of the samples with false identification at species-level belonged to the mitis group. MALDI-TOF MS misidentified 40 strains of the mitis group as pneumococci. Thus MALDI-TOF MS is not suitable for the identification of pneumococci. The reliability of identification results of other viridians group streptococci by MALDI-TOF MS varies.

### KEYWORDS:

Streptococci, viridans group streptococci, MALDI-TOF MS and bacterial identification.

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 STREPTOKOKIT JA NIIDEN IDENTIFIKAATIO</b>	<b>8</b>
2.1 Beetahemolyyttiset streptokokit	8
2.2 Viridans-ryhmän streptokokit	9
2.3 Streptokokkien identifikaatio	14
2.3.1 MALDI-TOF MS	15
2.3.2 Vitek ja Vitek 2	19
2.3.3 Pyrosekvensointi	20
2.3.4 Muut identifikaatiomenetelmät	21
2.3.5 Aikaisempia tutkimuksia	21
<b>3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT</b>	<b>24</b>
<b>4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>26</b>
4.1 Tutkimuksen metodologiset lähtökohdat	26
4.2 Tutkimuksen toteutus	27
4.3 Tutkimuksen eettiset näkökohdat	29
<b>5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>31</b>
5.1 Tyypikantanäytteiden tulokset	31
5.2 Potilasnäytteiden tulokset	35
5.3 Tulosten tarkastelu	41
<b>6 POHDINTA</b>	<b>44</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>47</b>

## LIITTEET

Liite 1. Tutkimuslupahakemus

Liite 2. Tyypikantanäytteiden nimet ja MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset (taulukko)

Liite 3. Potilasnäytteistä MALDI-TOF MS:lla, pyrosekvensoinnilla ja Vitek 2:lla saadut tulokset (taulukko)

## KUVAT

Kuva 1. Viridans-ryhmän streptokokkipesäkkeitä verimaljalla (American Society of Microbiology 2005).

Kuva 2. Brukerin microflex massaspektrometria -laite.	16
Kuva 3. Erään molekyylin massaspektri (Koivisto 2012 ).	17
Kuva 4. Brukerin MALDI-TOF MS-laitteen näytelevy.	28

## KUVIOT

Kuvio 1. Beetahemolyyttisten streptokokkien jaottelu (Harju 2012a).	9
Kuvio 2. Viridans-streptokokkien jaottelu ryhmittäin ja lajeittain (mukaillen Facklam 2002; Harju 2012).	12
Kuvio 3. Tyypikannoista MALDI-TOF MS:lla saatujen tulosten luotettavuus.	32
Kuvio 4. Tyypikannoista MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset jaoteltuna streptokokkiryhmittäin.	33
Kuvio 5. MALDI-TOF MS:lla tyypikantanäytteistä saatujen tulosten oikeellisuus streptokokkiryhmittäin jaoteltuna.	34
Kuvio 6. Muurahaishappouuton merkitys tuloksen saamiselle tyypikantanäytteistä prosenttiosuuksina.	35
Kuvio 7. Potilasnäytteistä MALDI-TOF:lla saatujen tulosten luotettavuus.	36
Kuvio 8. Potilasnäytteiden MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset jaoteltuna streptokokkiryhmittäin.	37
Kuvio 9. MALDI-TOF MS:lla saatujen tulosten vertailu pyrosekvensoinnilla saatuihin tuloksiin.	38
Kuvio 10. MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset ja niiden vertailu pyrosekvensoinnin tuloksiin jaoteltuna ryhmittäin.	39
Kuvio 11. MALDI-TOF MS:lla saatujen tulosten vertailu Vitek 2:lla saatuihin tuloksiin ryhmätasolla.	40
Kuvio 12. MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset ja niiden vertailu Vitek 2:n tuloksiin jaoteltuna ryhmittäin.	41

## TAULUKOT

Taulukko 1. Vitek 2:sta saatujen tulosten luotettavuustasot (bioMérieux Inc. 2006).	20
---	----

# 1 JOHDANTO

Viridans-ryhmän streptokokit kuuluvat alfa- ja nonhemolyyttisiin streptokokkeihin, joiden identifiointi on ollut ongelmallista aiemmin käytetyin fenotyyppisin menetelmin (Haanperä ym. 2007, 762). Viridans-streptokokkien suuri samankaltaisuus etenkin *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitiksen*, *Streptococcus oraliksen* ja *Streptococcus pseudopneumoniae* välillä johtaa usein vääriin identifiointituloksiin. Erittäin virulentin *S. pneumoniae* erottaminen muista streptokokeista on kliinisesti tärkeää. (Ikryannikova ym. 2011, 1709.) Pääasiallisesti viridans-ryhmän streptokokkien virulenssi on huono, mutta verenkiertoon päästessään ne voivat aiheuttaa vakavia ongelmia, kuten endokardiittia ja immuunipuutteisten sepsistä (Rantakokko-Jalava & Anttila 2010, 124-125). MALDI-TOF –massaspektrometriaa on viime vuosina alettu tutkia enemmän ja käyttää apuna mikro-organismien identifioinnissa ja tyypittämisessä. Menetelmä on aikaisempiin käytössä oleviin menetelmiin verrattuna nopeampi ja tehokkaampi. (Welker & Moore 2011, 2.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on viridans-ryhmän streptokokkien identifiointi Brukerin MALDI-TOF massaspektrometrialaitteella. Potilasnäytteistä saatuja tuloksia verrataan aiemmin Haanperän ym. (2007) pyrosekvensoinnilla ja Vitek 2:lla saamiin tuloksiin ja Lahdessa eri valmistajan MALDI-TOF MS-laitteella saataviin tuloksiin. Tyypikannoista saatuja tuloksia verrataan niiden tyypikantanimiin. Opinnäytetyön toimeksiantajana on TYKSLABin kliinisen mikrobiologian laboratorio, jossa MALDI-TOF massaspektrometri on otettu käyttöön bakteerien identifikaatiossa vuoden 2012 alussa. Tutkimme, kuinka hyvin TYKSLABin uudella MALDI-TOF MS –laitteella onnistutaan viridans-ryhmän streptokokkien identifioinnissa verrattuna aiemmin käytettyihin menetelmiin, tässä tapauksessa pyrosekvensointiin ja fenotyyppitykseen.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää MALDI-TOF –laitteen mahdollisuuksia viridans-ryhmän streptokokkien luotettavassa identifioimisessa. Viridans-

streptokokkien luotettava identifiointi MALDI-TOF -laitteella on tarpeen, koska se on monien muiden mikrobien identifiointissa rutiinikäytössä.

## 2 STREPTOKOKIT JA NIIDEN IDENTIFIKAATIO

Streptokokit ovat *Streptococcus*-sukuun kuuluvia grampositiivisia ja katalaasinegatiivisia kokkibakteereita, jotka esiintyvät ketjuina Gram-värjäyksessä (Facklam 2002, 613-614). Ne ovat yleensä fakultatiivisesti anaerobeja, viihtyvät parhaiten ruumiinlämpötilassa ja tarvitsevat kosteutta ja ravinteikasta ympäristöä. Streptokokkien virulenssi vaihtelee lajeittain. Ne tarttuvat ensisijaisesti pizaratartuntana. Ne voivat myös tarttua suoraan nieltä tai haavakontaktissa ja elintarvikkeiden kautta. (Ericson & Ericson 2007, 41.)

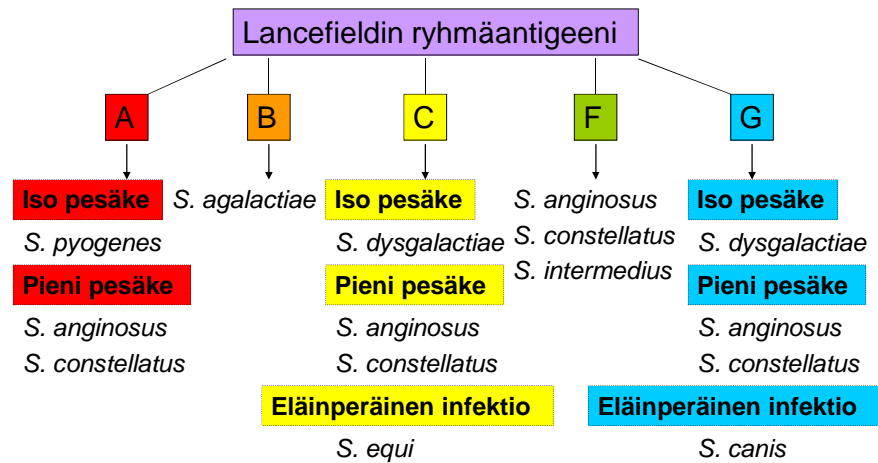
Streptokokit jaetaan hemolysointikyvyn mukaan alfa-, non- ja beetahemolyyttisiin streptokokkeihin. Beetahemolyyttiset streptokokit aiheuttavat verimaljalla täydellisen ja alfahemolyyttiset epätäydellisen hemolyyysin. (Ericson & Ericson 2007, 41.) Hemolyyysi verimaljalla johtuu bakteerin tuottamasta eksotoksiinista, hemolysiinistä (Huovinen ym. 2003, 111). Osittainen punasolujen hajoaminen eli alfahemolyyysi johtuu pääasiassa streptokokkien vetyperoksidituotannosta. Vetyperoksidi hajottaa osan punasoluista ja vapauttaa hemoglobiinia. (Facklam 2002, 619.) Tärkein beetahemolyyttinen streptokokkipatogeeni on A-ryhmään kuuluva *Streptococcus pyogenes* ja alfahemolyyttisistä tärkein on *Streptococcus pneumoniae* (Ericson & Ericson 2007, 41).

### 2.1 Beetahemolyyttiset streptokokit

Beetahemolyyttiset streptokokit jaetaan niiden polysakkarideista koostuvien pinta-antigeenien mukaan A, B, C, E, F ja G -ryhmän (Lancefieldin ryhmäantigeenit) streptokokkeihin (Ericson & Ericson 2007, 42; Facklam 2002, 614). Lancefieldin ryhmäantigeenit C tai G eivät määritä tiettyä streptokokkilajia, toisin kuin ryhmäantigeenit A (*S. pyogenes*) ja B (*S. agalactiae*). Suuripesäkkeisistä ryhmän C ja G streptokokeista kuitenkin suurin osa kuuluu *S. dysgalactiae*-lajin alalajiin *S. equisimilis*. (Rantakokko-Jalava & Anttila 2010, 122.) Kuviossa 1 on esitetty beetahemolyyttisten streptokokkien jaottelu.



## Ryhmäantigeenit ja streptokokkilajit



Kuvio 1. Beetahemolyyttisten streptokokkien jaottelu (Harju 2012a).

Tärkein streptokokkipatogeeni on beetahemolyyttinen *Streptococcus pyogenes*, eli A-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki, joka aiheuttaa noin 90 % kaikista streptokokki-infektioista. Yleisimmin *S. pyogenes* aiheuttaa nieluinfektioita, mutta se voi aiheuttaa myös vakavampia infektioita kuten sepsistä ja ruusua. (Ericson & Ericson 2007, 42.) Suuripesäkkeisiä beetahemolyyttisiä C- ja G-ryhmän streptokokkeja esiintyy hengitysteiden, ruuansulatuskanavan ja urogenitaalialueen normaalimikrobistossa. Ne kykenevät myös aiheuttamaan nielutulehduksen, ihotulehduksia ja selluliitteja. (Rantakokko-Jalava & Anttila 2010, 122.)

### 2.2 Viridans-ryhmän streptokokit

Normaaliflooran matalavirulenssisista (poikkeuksena virulentti *S. pneumoniae*) alfa- ja nonhemolyyttisistä streptokokeista käytetään yhteisnimitystä viridans-streptokokit. Alfahemolyyttisten streptokokkien erottaminen nonhemolyyttisistä streptokokeista ei ole tarpeellista. (Ericson & Ericson 2007, 50; Facklam 2002,

621-622.) Viridans-ryhmän streptokokit ovat hyvin heterogeeninen ryhmä streptokokkeja ja niitä tunnetaan yli 30 eri lajia (Doern ja Burnham 2010, 3829). Viridans-ryhmän streptokokit ovat leusiini-aminopeptidiposiivisia ja pyrrolidinoniamidaasinegatiivisia ja ne eivät kasva 6,5 % NaCl-rikasteliemessä. Suurin osa niistä on sappieskuliininegatiivisia. (Facklam 2002, 621-622.) Kaikki ei-beetahemolyttiset streptokokit eivät kuitenkaan täytä edellä mainittuja kriteereitä ja eivät näin ollen kuulu viridans-ryhmän streptokokkeihin. Facklam (2002) erottaa harvinaiset, ihmisellä esiintymättömät streptokokit omaksi sekalaiseksi ryhmäkseen, johon kuuluu kuusi lajia. Nämä lajit eivät ole sappiliukoisia, ne ovat optokiiniresistenttejä ja niillä ei ole ryhmäantigeneja (Facklam 2002, 625).

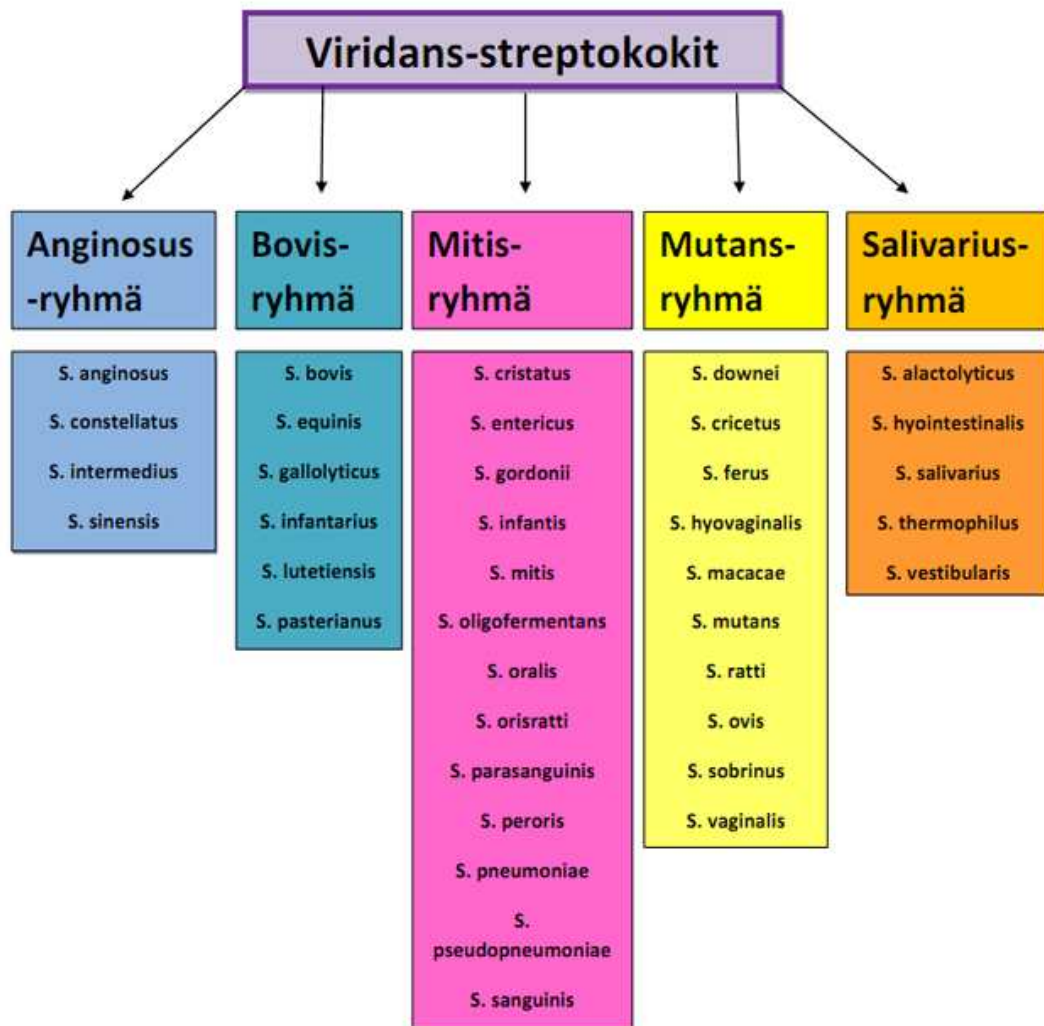
Viridans-ryhmän streptokokit kuuluvat etenkin nielun ja suuontelon normaalimikrobistoon. Matalasta virulenssistaan huolimatta ne voivat joskus aiheuttaa infektioita. Päästessään verenkiertoon huonokuntoisilta limakalvoilta viridans-streptokokit voivat aiheuttaa vakavia ongelmia kuten endokardiittia ja sepsistä. Viridans-streptokokit antavat hyvän suojan patogeenisempia beetahemolyttisiä streptokokkeja vastaan. (Ericson & Ericson 2007 50; Rantakokko-Jalava & Anttila 2010, 124.) Kuvassa 1 on alfa-hemolyttisiä streptokokkipesäkkeitä verimaljalla.



Kuva 1. Viridans-ryhmän streptokokkipesäkkeitä verimaljalla (American Society of Microbiology 2005).

Viridans-streptokokkien luokittelu on ollut ongelmallista ja muuttunut vuosikymmenten aikana (Doern ja Burnham 2010, 3829). Nykyään viridans-streptokokit jaetaan molekyyli-genetiikan ja biokemiallisten ominaisuuksiensa perusteella yleensä viiteen pääryhmään, jotka ovat mutans-, bovis-, anginosus-, salivarius- ja mitis-ryhmä (Facklam 2002, 621-622; Rantakokko-Jalava & Anttila 2010, 124). Muun muassa Doern ja Burnham (2010, 3829) luokittelevat viridans-ryhmän streptokokit kuitenkin kuuteen ryhmään, sanguinis-ryhmän ollessa kuudes. Ryhmät sisältävät useita eri streptokokkilajeja ja niiden alalajeja, ja samaan ryhmään kuuluvat lajit ovat läheistä sukua keskenään. Pneumokokki erotetaan usein viridans-ryhmän streptokokeista sen erilaisten virulenssitekijöiden vuoksi. (Facklam 2002, 621-622; Rantakokko-Jalava & Anttila 2010, 124.) Joissakin lähteissä pneumokokki katsotaan kuuluvaksi viridans-ryhmän streptokokkeihin (esimerkiksi Wessels ym. 2012 ja Haaperä ym. 2007) ja se luokitellaan mitis-ryhmään. TYKSLABin sairaalamikrobiologi Inka Harjun kanssa sovittiin, että tässä tutkimuksessa käytetään luokittelua,

jossa pneumokokki kuuluu viridansien mitis ryhmään. Kuviossa 2 on esitetty tässä tutkimuksessa käytettävä viridans-streptokokkien jaottelu ryhmiin ja lajeihin.



Kuvio 2. Viridans-streptokokkien jaottelu ryhmittäin ja lajeittain (mukaillen Facklam 2002; Harju 2012a).

Anginosus-ryhmä, johon kuuluvat *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* ja *Streptococcus intermedius* alalajeineen, tunnettiin aiemmin nimellä milleri. Ryhmän streptokokit voivat olla joko alfa-, beeta- tai

nonhemolyyttisiä ja niillä voi olla Lancefieldin ryhmäantigeeneista A, C, G, F tai ei ollenkaan ryhmäantigeenia, kuten yleensä *S. intermediuksella*. Anginosus-ryhmän streptokokit saattavat tuoksua ”toffeelle” ja ne antavat Voges-Proskauer –reaktiosta positiivisen tuloksen. (Doern ja Burnham 2010, 3830; Facklam 2002, 617.)

Bovis-ryhmän streptokokit tuottavat asetoiinia ja ne ovat eskuliiniposiitivisia ja sorbitolinegatiivisia. Ne luokitellaan D-ryhmään kuuluviksi. Ryhmän bakteereita tavataan yleisimmin paksusuolen syöpää sairastavien potilaiden veriviljelynäytteissä. Osa ryhmän bakteereista liittyy myös endokardiittiin. (Doern ja Burnham 2010, 3830.)

Mutans-ryhmän streptokokeista yleisimmät ihmiseltä löydetty lajit ovat *Streptococcus mutans* ja *Streptococcus sobrinus*. Mutans-ryhmän streptokokit esiintyvät useimmiten suuontelossa ja ovat fenotyyppisesti hyvin toistensa kaltaisia. Ne tuottavat asetoiinia ja ovat eskuliiniposiitivisia. (Doern & Burnham 2010, 3830.)

Salivarius-ryhmän streptokokeista vain *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularius* ja *Streptococcus infantarius* on löydetty ihmiseltä. Ryhmän streptokokit ovat läheistä sukua Bovis-ryhmän streptokokeille sekä fenotyyppisten ominaisuuksien, että 16S rRNA-analyysin perusteella. Osa ryhmän bakteerikannoista reagoi D-ryhmän antiseerumiin, mutta niillä ei välttämättä silti ole D-ryhmäantigeenia, sillä antiseerumi ei ole tehty nonhemolyyttisiä, vaan beetahemolyyttisiä kantoja varten. (Facklam 2002, 623.)

Mitis-ryhmän streptokokit eivät tuota asetoiinia ja ne ovat arginiini-, eskuliini-, sorbitoli- ja mannitolinegatiivisia (Doern ja Burnham 2010, 3830). Niitä löytyy erityisesti hampaiden pinnoilta, mutta ne ovat mukana myös muiden tautien patogeenisissä (Barsotti ym. 2002, 687). Mitis-ryhmään kuuluu uusi laji *S. pseudopneumoniae*, joka on läheistä sukua kyseisen ryhmän *S. pneumoniaelle*. *S. pseudopneumoniaella* ei ole pneumokokin lailla kapselia, sen herkkyys optokiinille vaihtelee ja se ei ole sappiliukoinen. *S. pseudopneumoniaen* kliinisestä merkityksestä ei olla vielä täysin selvillä. (Wessels ym. 2012, 1171.)

*Streptococcus pneumoniae* kuuluu streptokokkisuvun mitis-ryhmään. Se on alfa-hemolyttinen diplokokki, joka kuuluu nielun normaaliflooraan. Pneumokokki kasvaa maljalla vaaleana säännöllisen pyöreänä pesäkkeenä, jonka keskellä on syvennys ja reunoilla matalat vallit. Pneumokokilla on fagotsytoosilta suojeleva polysakkaridikapseli, joka on sen tärkein virulenssitekijä. Pintaproteiinit, entsyymit ja toksiinit vaikuttavat myös pneumokokin virulenssiin. Polysakkaridikapselin rakenteen perusteella pneumokokit voidaan erotella 91 serotyyppiin, joista vain osa on yleisiä taudinaiheuttajia. (Ericson & Ericson 2007, 50; Kauma & Virolainen-Julkunen 2010, 112-116.)

Pneumokokki on yleinen taudinaiheuttaja ja siihen liittyy suuri sairastavuus ja kuolleisuus tehokkaista mikrobilääkkeistä huolimatta. On tavallista, että pneumokokki kolonisoi erityisesti päiväkotikäisten lasten nenänielun. Nenänielun pneumokokkikolonisaatio voi aiheuttaa välikorvan infektiota. (Ericson & Ericson 2007, 50; Kauma & Virolainen-Julkunen 2010, 112-115.) Pneumokokki on yleisin keuhkokuumeen aiheuttaja. Keuhkokuumeen yhteydessä pneumokokki voi päästä verenkiertoon ja aiheuttaa vakavia invasiivisia infektiota, kuten sepsistä ja meningiittiä. Pneumokokki on myös yleinen sinuiitin ja konjunktiviitin aiheuttaja. (Zbinden ym. 2010, 523.)

### 2.3 Streptokokkien identifikaatio

Bakteerien identifikaatio perustuu kantojen luonnehdintaan ja se keskittyy tunnistamaan fenotyyppien ja genotyyppien yhtäläisyyksiä. Identifikaatiolle on välttämätöntä, että käytössä on vakiintunut taksonominen systeemi ja nimikkeistö. (Welker & Moore 2011, 2.) Tavallisesti käytetyt pneumokokin tunnistuskeinot ja -menetelmät kuten pesäkemorfologia, sappiliukoisuustesti, optokiiniherkkyys sekä kaupalliset API 20 ja Vitek 2 -menetelmät eivät aina anna virheetöntä tulosta. Siksi pneumokokin erottaminen muista sille läheistä sukua olevista lajeista on ongelmallista. (Zbinden ym. 2010, 523.) Pneumokokki on vaikea erottaa erityisesti *S. pseudopneumoniaesta*, *S. mitiksestä* ja *S. oraliksesta* hyvin läheisen sukulaisuuden takia. Näiden streptokokkien 16S rRNA geenisekvenssit ovat vähintään 99 % identtisiä ja lajien välillä tapahtuu

horisontaalista geenien siirtymistä, mikä hämärtää lajien rajoja entisestään. Käytännössä vääriä identifikaatioita näiden lajien välillä tapahtuu kliinisessä laboratoriossa. (Scholz ym. 2012, 1968; Werno ym. 2012, 2863.)

### 2.3.1 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS –menetelmällä voidaan mitata mikrobien proteiinien massaa lentoaikamassaspektrometrisesti matriisiavusteisen laserdesorptioionisaation avulla. Lentoajan avulla saadaan spektri, joka analysoidaan tietyllä ohjelmalla ja sitä verrataan viitetietokannassa oleviin tunnettujen lajien proteiinien spektreihin. (Welker & Moore 2011, 4-5; Seng ym. 2009, 543-544.) MALDI-TOF MS:lla voi identifoida mikro-organismeja myös esimerkiksi niiden DNA:n, lipidien tai rasvahappojen perusteella, mutta proteiineja on runsaiten (50 %) solun kuivamassassa (Dare 2010, 119).

Brukerin MALDI-TOF MS –menetelmässä käytetään microflex massaspektrometria ja FlexControl- ja Maldi Biotyper 3 -ohjelmistoa (Wessels ym. 2012, 1172). Kuvassa 2 on TYKSLABin mikrobiologian laboratoriossa käytössä oleva Brukerin MALDI-TOF MS-analysaattori.

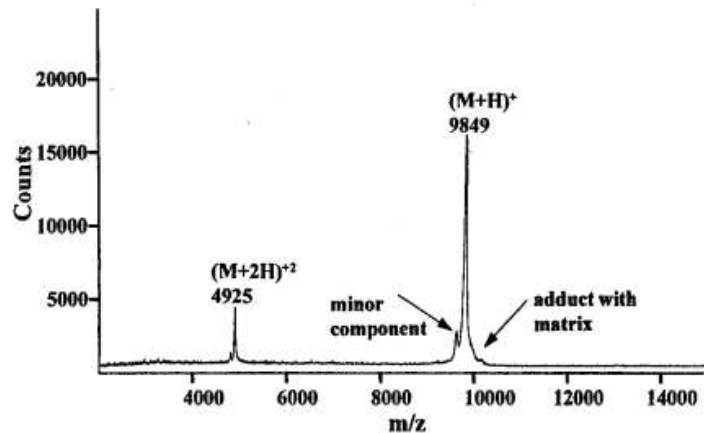


Kuva 2. Brukerin microflex massaspektrometria -laite.

Massaspektrometria kehitettiin tuomaan tietoa molekyyliarakenteista ja se perustuu molekyylien ionisoimiseen. Ionisoimisen jälkeen ionien massa erotellaan analysaattorin tyhjiössä massa/varaus-suhteen ( $m/z$ ) perusteella ja lopuksi detektori havaitsee ionien massa/varaus-suhteen tuottaen molekyylin massaspektrin, joka kertoo kuinka paljon tietyn massa/varaus-suhteen omaavia ioneja näytteessä esiintyy. Kuvassa 3 on esimerkki laitteella saatavasta spektristä. Ionisointitekniikoita on useita, muun muassa nopeilla atomeilla pommittaminen (FAB), kemiallinen ionisaatio (CI), elektroni-ionisaatio (EI) sähkösumutus (ESI) ja matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio (MALDI). Näistä eniten käytettyjä ovat ESI ja MALDI, jotka soveltuvat hyvin suurien molekyylien peptidi- ja proteiinimassa-analyyseihin (Dare 2010, 117-118, Bruker Daltonics GmbH 2004, 1-2.)



Erään suuren biomolekyylin MALDI-spektri. Typpilaser (355 nm), matriisina  $\alpha$ -syano-4-hydroksikanelihappo.



Kuva 3. Erään molekyylin massaspektri (Koivisto 2012 ).

MALDI-ionisointitekniikka soveltuu hyvin kokonaisten bakteerisolujen analysointiin. Menetelmä sai alkunsa 1980-luvulla. Massaspektrometriassa tarvittava näytemäärä on hyvin pieni (Dare 2010, 118). Näytteenä MALDI-TOF MS:ssa käytetään yön yli agar-maljalla kasvanutta mikrobipesäkettä. (Bruker Daltonics GmbH 2011, 15). Analysoitavan kannan tulisi kasvaa maljalla puhtaana. TYKSLABin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa analysoitava näyte siirretään suoraan näytelevylle. Suorasyötön (direct transfer) lisäksi muita näytteen esikäsittelymenetelmiä ovat muurahaishappouutto ja trifluorietikkahappouutto (TFA extraction) itiöillisille mikro-organismeille. Näitä menetelmiä käytetään kun suorasyötöllä ei saada tuloksia. (Bruker Daltonics GmbH 2011, 155.) Muurahaishappouuton periaatetta ei tunneta kunnolla, mutta siinä muurahaishappo irrottaa paremmin proteiineja solun sisältä analysoitavaksi (Inka Harju, sairaalamikrobiologi, suullinen tiedonanto 14.9.2012).

Laitteessa näytelevyllä olevaa analyyytiä pommitetaan fotoneilla, jotka yleensä tuotetaan pulssilaserilla syntyvän UV-valon avulla ja syntyneiden ionien massa erotellaan lentoajan (TOF, time-of-flight) perusteella. Jotta analyyyti ionisoituisi laserin vaikutuksesta, tarvitaan orgaaninen yhdiste, matriisi, joka absorboi UV-

valoa käytettävällä aallonpituudella. (Dare 2010, 118.) Matriisin sisältämä orgaaninen liuotin vapauttaa solun proteiinit analysoitaviksi. Proteiinit ovat pääasiassa ribosomaalisia proteiineja. Analyytti kiteytyy näytealustalla yhdessä matriisin kanssa, jonka jälkeen laitteeseen syötetyllä näytelevyllä matriisi haihtuu laserin vaikutuksesta vapauttaen positiivisesti varautuneita proteiineja. Proteiini-ionit kiihdytetään tämän jälkeen elektrostaattisesti ja ne siirtyvät lentoalueelle nopeudella, joka on verrannollinen niiden massaan. Mittaamalla aika kiihdytyksestä detektorille saapumiseen voidaan laskea ionien massa. (Bruker Daltonics GmbH 2011, 16)

MALDI Biotyper -ohjelmisto vertaa syntynyttä spektriä tietokannassa oleviin mikrobien tunnetuihin spektreihin ja antaa tämän perusteella tuloksen, jolla on tietty score value eli vastaavuuspisteet. Jokaisella lajilla on omanlaisensa massaspektri, ”molekyyлисormenjälki”, jota voidaan verrata tuhansien muiden mikrobien ”sormenjälkiin”. (Bruker Daltonics GmbH 2011, 16.) TYKSLABin klinisen mikrobiologian osaston työohjeiden (2012) mukaan tulosta voidaan pitää luotettavana, jos sen vastaavuuspisteet ovat  $\geq 2.000$  ja mikrobin pesäkemorfologia ja muut ominaisuudet tukevat tulosta eikä voida epäillä näytteen puhtautta. Kohtalaisen luotettavalle tulokselle Maldi Biotyper antaa score valuen väliltä 1.700 ja 1.999 ja tulos näkyy osastolla käytettävässä MALDI Biotyper RTC -ohjelmassa keltaisella värillä. Tällöin konsultoidaan lääkäriä tai sairaalamikrobiologia. Näytteet, joille ei saada riittävän hyvää tunnistusta (score value  $< 1.700$ ) näkyvät ohjelmassa punaisina. Bruker Daltonicsin ohjekirjan (2011) mukaan mitä suurempi score value on, sitä todennäköisemmin saatu identifikaatitulos on oikea. Suurin mahdollinen score value on 3. On kuitenkin muistettava, että vaikka score value olisi kuinka korkea, esittää se silti vain todennäköisyyttä, jolla tulos on oikea. (Bruker Daltonics GmbH 2011, 17.)

MALDI-TOF MS:llä on tähän mennessä saatu lupaavia tuloksia viridans-ryhmän streptokokkien identifikaatiossa, mutta *S. pneumoniae* erottaminen läheisistä sukulaisistaan on ollut ongelmallista (Werno ym. 2012, 2863). MALDI-TOF MS on kuitenkin rajoituksistaan huolimatta edullinen ja nopea

identifikaatiomenetelmä ja se on otettu käyttöön viime vuosien aikana useissa kliinisissä mikrobiologian laboratorioissa (Justesen ym. 2011, 4314).

### 2.3.2 Vitek ja Vitek 2

Vitek on lähes automatisoitu organismien identifikaatiomenetelmä. Näytemateriaalina käytettävä bakteerisuspensio tehdään manuaalisesti natriumkloridiin ja sen pitoisuus varmistetaan densicheck –laitteella. Näyte ja identifiointikortti asetetaan koneeseen siihen tarkoitettussa telineessä. (Aslanzadeh 2010, 113.) Vitek 2 puolestaan on täysin automatisoitu fenotyyppitykseen perustuva identifikaatiomenetelmä bakteereille ja hiivoille (Haanperä ym. 2007, 762-763).

Vitekin ja Vitek 2:n menetelmä perustuu tietoon organismien erityispiirteistä ja niille tyypillisistä analysoitavista reaktioista. Tiedot organismien tyypillisistä reaktioista on kerätty tunnetuista bakteerikannoista. Reaktioissa on käytetty erottelevien biokemikaalien kokoelmaa. (bioMérieux Inc. 2006.) Menetelmässä käytetään eri organismeille tarkoitettuja identifikaatio- ja herkkyyskortteja, joissa on pieniä kaivoja (Aslanzadeh 2010, 113). Streptokokkien ja muiden grampositiivisten bakteerien identifioinnissa käytetään kolorimetristä GP-korttia, joka koostuu 43 biokemiallisesta testistä. Tietokanta sisältää yli 30 streptokokkilajia mukaan lukien viridans-streptokokkilajeja ja joitakin niiden alalajeja. (Haanperä ym. 2007, 762-763.) Lisäksi se sisältää runsaasti muita grampositiivisia kokkeja, kuten monia enterokokki- ja stafylokokkilajeja. Harvinaiset ja uudet lajit eivät välttämättä löydy GP-tietokannasta. (bioMérieux Inc. 2006.)

Jos yksiselitteinen identifiointi ei ole Vitek 2:lla mahdollista, saadaan vastauksena lista mahdollisista vaihtoehdoista tai ei lainkaan vastausta. Tällöin on käytettävä täydentäviä tunnistusmenetelmiä. Laite antaa aina prosentteina todennäköisyyden siitä onko identifioinnin tulos oikea. Prosenttiluku kertoo kuinka hyvin havaitut reaktiot täsmäävät tietyn organismin tyypillisiin reaktioihin. Tulosten luotettavuuden tasot on esitetty taulukossa 1. Kun reaktiot sopivat kahteen tai kolmeen organismiin eikä niitä voida erotella toisistaan,

todennäköisyysarvot kertovat missä järjestyksessä reaktiot parhaiten täsmäävät listattuihin vaihtoehtoihin. (bioMérieux Inc. 2006.)

Taulukko 1. Vitek 2:sta saatujen tulosten luotettavuustasot (bioMérieux Inc. 2006).

Luotettavuustaso	Oikean tuloksen todennäköisyys %
Excellent	96-99
Very good	93-95
Good	89-92
Acceptable	85-88
Low discrimination	2-3 vaihtoehtoista tulosta
Unidentified organism	yli 3 vaihtoehtoista tulosta

### 2.3.3 Pyrosekvensointi

Pyrosekvensointi on geenisekvensointiin perustuvaa bakteerien identifiointia, jossa käytetään PCR-tekniikkaa bakteerien monistamiseen ja hyödynnetään bakteerien 16S-rDNA:n emäsjärjestykseen perustuvaa fylogeneettistä luokitusta. Bakteri voidaan monistaa viljelystä kannasta tai suoraan näytteestä. Fylogeneettisenä merkkimolekyylinä käytetään ribosomien pienen alayksikön sisältämää RNA:a (16S-rRNA). Bakteerien 16S-rRNA-geeneissä on vaihtelevia ja siksi informoivia emäksiä 974 (63,2 %), minkä vuoksi ne ovat hyviä merkkimolekyyliä. (Lindholm & Eerola 2010, 57-64.)

Monistuksessa käytetään alukkeita geenin muuttumattomana pysyvältä alueelta. Monistettu DNA sekvensoidaan ja geenisekvenssiä verrataan tietokantaan. (Lindholm & Eerola 2010, 64). Koko 16S-rDNA tai vain osa siitä voidaan monistaa. Mitä pidempiä sekvenssejä määritetään, sitä luotettavampi saatu tulos on. (Han 2010, 324.) Pyrosekvenssoinnissa voidaan määrittää melko lyhyitäkin sekvenssejä, mutta yleensä jo 60 emästä riittää määrittäminen. (Haanperä ym. 2007, 762.)

Pyrosekvenssoinnissa nukleotidien yhteenliittymän muotoa muutetaan entsyymaattisesti ja saadaan aikaan valoreaktio. Reaktiossa vapautunut valo havainnoidaan ja esitetään piikkihistogrammina eli pyrogrammina. 16S-rRNA-geenin sekvensointia pidetään tehokkaana keinona identifioida kliinisesti

merkittäviä kokkibakteereja viridans-streptokokit mukaan lukien. Pyrosekvensointi on muihin sekvensointimenetelmiin verrattuna edullista ja nopeaa. (Haanperä ym. 2007, 762.)

#### 2.3.4 Muut identifikaatiomenetelmät

Optokiini estää spesifisesti pneumokokin kasvua, joten sen erottelussa muista alfa-hemolyttisistä viridans-ryhmän streptokokeista voidaan käyttää optokiiniekkoa. Pneumokokki saattaa kuitenkin joskus olla optokiiniresistentti. Tällöin tunnistuksessa voidaan käyttää sappiliukoisuustestiä tai pneumokokille spesifisten geenien osoitusta PCR-menetelmällä. (Kauma & Virolainen-Julkunen 2010, 116.)

Pneumokokki on sappiliukoinen toisin kuin muut streptokokit ja muut grampositiiviset kokit, joten se voidaan erottaa niistä sappiliukoisuustestin avulla. *S. pneumoniae* sisältää autolyyttistä amidaasia, joka aktivoitaessa sappisuoloilla hajottaa sidoksen soluseinän alaniinin ja peptidoglykaanin rakenneosan välillä. Pesäkkeiden liukeneminen tai hajoaminen käsittelyn jälkeen kertoo testituloksen olevan pneumokokkipositiivinen. (Aslanzadeh 2010, 93.)

API-identifikaatiomenetelmässä käytetään muovista liuskaa, jossa on pieniin taskuihin lisättyjä erilaisia kuivattuja substraatteja. Menetelmä perustuu tutkittavien bakteerien entsymaattiseen aktiivisuuteen tai hiilihydraattien käymiseen. API 20 Strep -testillä voidaan identifioida streptokokkeja ja enterokokkeja. (Aslanzadeh 2010, 110.)

#### 2.3.5 Aikaisempia tutkimuksia

Ikryannikova ym. (2011) käsittelivät viridans-streptokokkien (VGS) identifioinnin ongelmia tutkimuksessaan *Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice*. He analysoivat 50 alfa-hemolyttistä streptokokki-isolaattia (jotka oli identifioitu streptokokeiksi fenotyyppisin menetelmin ja jaoteltu *Streptococcus pneumoniae*ksi ja muuksi VGS:ksi optokiiniekon perusteella) sekä MALDI-TOF MS –menetelmällä että MLSA-

menetelmällä (multilocus sequence analysis) ja totesivat, että eri menetelmillä saadut tulokset erosivat huomattavasti toisistaan. Isolaateille tehtiin myös sappiliukoisuustesti ja lateksiagglutinaatiokoe. MALDI-TOF MS:lla 48 analysoiduista isolaateista identifioituivat *S. pneumoniaeksi* ja kaksi *S. oralikseksi* kun taas MLSA:lla 46 isolaattia identifioitiin *S. mitikseksi* ja neljä isolaattia *S. oralikseksi*. Tulokset olivat vielä vähemmän yhtenevät kun otettiin huomioon myös optokiinitesti, lateksiagglutinaatio ja sappiliukoisuus. (Ikryannikova ym. 2011, 1709-1714.)

Haanperä ym. (2007) analysoivat alfa-hemolyttisiä streptokokkeja pyrosekvensoimalla niiden 16S rRNA:ta koodittavien geenien vaihtelevia alueita ja VITEK 2:lla käyttäen GP-korttia isolaattien identifioimiseen. He analysoivat myös kaikkien tutkittujen streptokokkilajien tyyppikantoja pyrosekvensoimalla. Tutkituista veren (n=99) ja nielun (n=25) streptokokki-isolaateista 75 % identifioitiin molemmilla menetelmillä samaan ryhmään kuuluviksi, mutta lajitasolla vain 46 % tuloksista olivat yhteneviä. Kymmenelle isolaatille ei saatu lainkaan tulosta VITEK 2:lla ja neljälle ei saatu tulosta pyrosekvensoimalla. Molemmilla menetelmillä oli vaikeuksia tunnistaa *S. mitis* ja *S. sanguinis*-ryhmään kuuluvia streptokokkikantoja. Pyrosekvensoinnilla todettiin myös huomattavaa sekvenssivariaatiota, ja vain 32,3 %:lla isolaateista löydettiin tyyppikantojen kanssa identtisiä sekvenssejä. (Haanperä ym. 2007, 762-769.)

Westling ym. (2007) identifioivat tutkimuksessa *Identification of species of viridans group streptococci in clinical blood culture isolates by sequence analysis of the RNase P RNA gene, rnpB* viridans-streptokokkilajeja RNAasi P RNA-geenin sekvenssianalyysillä (rnpB) ja vertasivat saatuja tuloksia API 20:lla saatuihin tuloksiin. 132 veriviljelynäytteistä saaduista viridans-isolaateista 131 saatiin identifioitua rnpB:n avulla. Endokardiittia sairastavilla yleisimpiä olivat *S. oralis*, *S. sanguinis* ja *S. gordonii* -kannat ja hematologisia sairauksia sairastavilla *S. mitis* ja *S. oralis* -kannat. RnpB analyysin tuloksia API 20:lla saatuihin tuloksiin voitiin verrata 76 isolaatista. 51 % (39 isolaattia) eri menetelmillä saaduista tuloksista olivat yhteneviä lajitasolle, 21 isolaattia olivat yhteneviä ryhmätasolle ja 55 isolaatille ei saatu tulosta API 20:lla. Yhteneviä

tuloksia saatiin lajeille *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* ja *S. mutans*, *S. anginosus* ja *S. intermedius*. (Westling ym. 2007, 204-210.)

### 3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena on identifioida Brukerin MALDI-TOF massaspektrometrialaitteella viridans-ryhmän streptokokkikantoja. Tutkimuksessa käytettävä aineisto on kerätty valmiiksi ja sama aineisto on identifioitu Lahden klinisen mikrobiologian laboratoriossa eri valmistajan (bioMérieux) vastaavalla laitteella. Käsiteltävän aineiston koko on 154 bakteerisolaa. Tutkimuksessa käytetään osittain samaa aineistoa, jonka Haanperä ym. (2007) analysoivat pyrosekvensoimalla ja Vitek 2:lla tutkimuksessaan *Identification of Alpha-Hemolytic Streptococci by pyrosequencing the 16S rRNA Gene and by use of VITEK 2*. MALDI-TOF MS:lla potilasnäytteistä saatuja tuloksia verrataan pyrosekvensoinnilla ja Vitek 2:lla saatuihin tuloksiin. Tyypikannoista saatavia tuloksia verrataan niiden tyypikantanimiin. Tutkimuksessa on tarkoitus verrata Brukerin MALDI-TOF MS -laitteella saatavia tuloksia myös Lahden klinisen mikrobiologian osaston eri valmistajan MALDI-TOF MS:lla saamiin tuloksiin.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää MALDI-TOF MS-laitteen mahdollisuuksia viridans-ryhmän streptokokkien luotettavassa identifiomisessa ja erityisesti pneumokokin erottamisessa muista viridans-streptokokeista. Viridans-streptokokkien luotettava identifiointi MALDI-TOF MS -laitteella on tarpeen, koska se on TYKSLABin klinisen mikrobiologian laboratoriossa myös monien muiden mikrobien identifiointissa rutiinikäytössä. MALDI-TOF MS -laitteen käyttö on hyödyllistä muun muassa siksi, että sillä saadaan muihin menetelmiin verrattuna tulokset nopeasti. Viridans-streptokokkien muuttuneen taksonomian ja epäselvien lajirajojen vuoksi niiden tunnistaminen on ongelmallista.

Tutkimuksen pääongelma on

- Viridans-ryhmän streptokokkien erottaminen toisistaan Brukerin MALDI-TOF MS -laitteella



Tutkimuksen alaongelmia ovat

- Kuinka suuresta osasta aineistoa MALDI-TOF MS -laite pystyy antamaan luotettavan vastauksen?
- Miten eri menetelmillä analysoitavasta aineistosta aiemmin saadut tulokset vastaavat MALDI-TOF MS -laitteella saatavia tuloksia?
- Miten luotettavasti MALDI-TOF MS –laite tunnistaa *S. pneumoniae*?

## 4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

### 4.1 Tutkimuksen metodologiset lähtökohdat

Tutkimus on menetelmältään enimmäkseen määrällinen eli kvantitatiivinen tutkimus. Kvantitatiivisen tutkimusmenetelmän ominaispiirteitä ovat tiedon strukturointi, mittaaminen, tiedon esittäminen numeroin, tutkimuksen objektiivisuus ja vastaajien suuri lukumäärä (Vilkka 2007, 13). Vilkan (2007, 17) mukaan suositeltava havaintoyksiköiden vähimmäismäärä on 100. Tässä tutkimuksessa aineiston koko on 154 bakteeri-isolaattia. Tutkimusaineiston kerääminen, sen käsittely sekä analysointi ja tutkimusaineiston tulkinta ovat omia vaiheitaan kvantitatiivisessa tutkimuksessa (Vilkka 2007, 106).

Kvantitatiiviseen tutkimukseen kuuluu olennaisena osana aluksi laadittava tutkimuksen viitekehys, joka suoritetaan ennen aineiston keruuta. Sen avulla asetetaan tutkittava ilmiö johonkin teoreettiseen kontekstiin. Myös keskeisten käsitteiden määrittely on tärkeää, samoin kuin aiempien tutkimusten esittely sekä mahdollinen hypoteesien laatiminen. (Hirsjärvi ym. 2003, 131.) Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan aseteta hypoteeseja aiheesta.

Tutkimuksen luotettavuutta arvioidaan validiteetin ja reliabiliteetin avulla. Nämä yhdessä muodostavat tutkimuksen kokonaisluotettavuuden. Validius eli pätevyys tarkoittaa tutkimusmenetelmän tai mittarin kykyä mitata sitä, mitä tutkimuksen on tarkoituskin mitata. Reliabiliteetti taas tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta eli kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. (Hirsjärvi ym. 2003, 2016; Vilkka 2007, 149-150.) Tutkimuksen luotettavuuden edellytyksenä on korkea validius, jota puolestaan vahvistaa korkea reliabiliteetti, tosin korkea reliabiliteetti ei aina takaa korkeaa validiutta (Soininen 1995, 120).

## 4.2 Tutkimuksen toteutus

Tutkimuksen käytännön osuus suoritettiin toukokuussa 2012 TYKSLABin kliinisen mikrobiologian laboratoriossa (osasto 938). Tutkimukselle haettiin ja saatiin tutkimuslupa (LIITE 1).

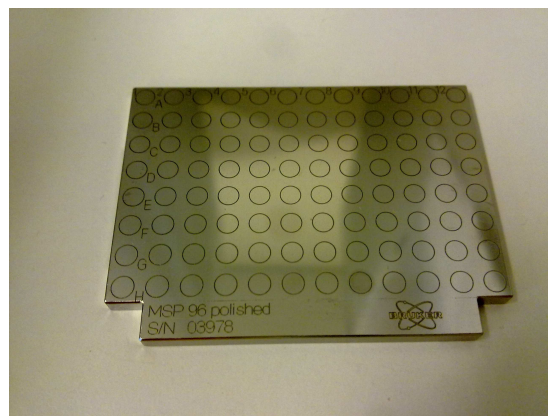
Tutkijat perehtyivät MALDI-TOF MS –laitteen käyttöön jo aiemmin keväällä suoritetussa syventävien opintojen harjoittelussa. Ennen analyysien aloittamista laitteen käyttöä kerrattiin ja sairaalamikrobiologi Inka Harju perehdytti tutkijat näytteiden uuttamiseen muurahaishapolla.

Tutkimusaineisto koostui yhteensä 154 (=n) näytteestä. Näytteistä 55 (=n) oli kerätty tyypikantakokoelmista. Käytettyjä tyypikantakokoelmia olivat CCUG (Culture Collection, University of Göteborg), DSM (Deutsche Sammlung von Microorganismen GmbH) ja LGM (Laboratorium voor Mikrobiologie, Universiteit Ghent) (Haanperä ym. 2007, 765). Mikrobitaksonomiassa jokaiselle uudelle lajille valitaan tyypikanta. Laji määritellään tämän tyypikannan eli nimikkoviljelmän ominaisuuksien perusteella. Kantakokoelma on mikrobikantojen kokoelma, joka sisältää hyvin tunnettuja mikro-organismeja ja on kansainvälisesti hyväksytty. (Ehder (toim.) 2005, 8.) Tutkittavista näytteistä 99 (=n) oli potilaiden veriviljelynäytteistä eristettyjä bakteerikantoja. Potilasnäytteet oli kerätty vuosina 1993-2004 Turun yliopistollisen keskussairaalan potilaista (Haanperä ym. 2007, 763). Kaikki bakteeri-isolaatit olivat valmiina syväjäädytettynä maitoglyseriiniputkissa -70 °C:ssa mikrobiologian osastolla. Samoja kantoja käytettiin myös Haanperän ym. (2007) tutkimuksessa. Käytetty aineisto on kerätty THL:n ja TYKSLABin toimesta (Haanperä ym. 2007, 762).

Tutkittavista bakteeri-isolaateista (n=154) tehtiin viljelyt lampaanverimaljoille. Tutkimuksessa käytettiin isolaateille jo valmiiksi tehtyä numerointia. Viljeltyjä maljoja inkuboitiin hiilidioksidirikasteisessa (5 %) lämpökaapissa +35°C:ssa 16-24 tuntia. Kannat, jotka eivät kasvaneet ensimmäisellä viljelykerralla viljeltiin uudelleen. Tyypikantanäytteistä kolme haettiin THL:sta, koska ne eivät

kasvaneet toisellakaan viljelykerralla. Näistä kannoista yhtä ei saatu lainkaan kasvamaan.

Tutkittavat bakteeri-isolaatit analysoitiin TYKSLABin kliinisen mikrobiologian laboratorion työohjeen (2012) mukaisesti MALDI-TOF MS -laitteella. Bakteeripesäkkeestä otettiin puutikulla pieni määrä, joka laitettiin näytelevylle (kuva 4) kahteen peräkkäiseen paikkaan. Jokaisesta isolaatista toisen näytteen päälle lisättiin 1 µl 70 % muurahaishappoa (pikauutto), jonka annettiin kuivua. Seuraavaksi molempiin näytepaikkoihin (spot) pipetoitiin 1 µl matriisiliuosta. Matriisiliuos on kyllästetty liuos, joka tehdään lisäämällä  $\alpha$ -syano-4-hydroksikanelihappojauheeseen asetonitriiliä (50 %), trifluoroetikkahapon (2,2 %) ja ultrapuhtaan veden seosta (Wessels ym. 2012, 1171). Matriisiliuoksen kuivuttua näytelevy asetettiin laitteeseen analyysia varten.



Kuva 4. Brukerin MALDI-TOF MS-laitteen näytelevy.

Isolaatit, joista ei saatu tulosta tai se ei ollut Maldi Biotyperin mukaan luotettava (score value < 2), viljeltiin uudestaan ja niille tehtiin muurahaishappouutto TYKSLABin kliinisen mikrobiologian laboratorion työohjeen (2012) mukaan. Muurahaishappouutto tehtiin sekoittamalla bakteerimassaa ultrapuhtaaseen veteen ja absoluuttiseen etanoliin eppendorf-putkessa. Solut sentrifugoitiin ja supernatantti kaadettiin pois. Sentrifugointi toistettiin etanolijäämien poistamiseksi. Pelletin päälle lisättiin 70 %:sta muurahaishappoa 10-20 µl pelletin koosta riippuen, jonka jälkeen seos sekoitettiin ja sen annettiin seistä

kaksi minuuttia. Tämän jälkeen putkeen lisättiin asetonitriiliä saman verran kuin muurahaishappoa ja putki sekoitettiin ja sentrifugoitiin. MALDI-TOF MS:n näytelevylle pipetoitiin 1 µl supernatanttia ja sen kuivuttua saman verran matriisiliuosta. Uutetut näytteet ajettiin laitteella uudestaan rinnakkaisina. Uuttamista ei uusittu, vaikka luotettavaa tulosta ei olisikaan saatu.

Tuloksista laadittiin taulukoita, joissa on eriteltyinä tulokset tyyppikannoista ja potilasnäytteistä. Aiemmin pyrosekvensoinnilla ja Vitek 2:lla potilasnäytteistä saatuja tuloksia verrattiin omissa taulukoissaan MALDI-TOF MS:lla saatuihin tuloksiin. Tyyppikannoista MALDI-TOF MS:lla saatuja tuloksia varrattiin niiden kantakokoelman nimiin.

#### 4.3 Tutkimuksen eettiset näkökohdat

Eettistä analyysiä voidaan tarkastella viiden eri elementin pohjalta. Ne ovat eettisen kysymyksen, asianosaisten, oikeuksien ja velvollisuuksien ja vaihtoehtojen ja niiden tuottamusten tunnistaminen sekä päätöksentekijän oman aseman huomioiminen (Clarkeburn & Mustajoki 2007, 29-32). Ihmisiin kohdistuvassa tutkimuksessa on otettava huomioon koehenkilöiden suostumus ja se, että he ovat suostumuksen antaessaan ymmärrettävästi perehtyneet tutkimukseen liittyviin asioihin (Hirsijärvi ym. 2003, 26). Tässä tutkimuksessa aineisto on jo valmiiksi hankittu ja tutkimus ei ole ihmisiin kohdistuva, joten aineiston hankintaan tai koehenkilöiden suostumukseen ja tiedonantoon liittyviä eettisiä ongelmia ei tutkimuksessa ole. Myös käytettävä laitteisto on jo valmiiksi hankittu ja käytössä. Tietosuojaan ja salassapitoon liittyviä eettisiä ongelmia ei ole, sillä tutkimuksessa ei käytetä henkilötietoja eikä käsitellä liike- tai ammattisalaisuuksia.

Tutkimusta tehdessä on kaikissa tilanteissa vältettävä epärehellisyyttä, jossa keskeisiä asioita ovat plagiointi, toisten tutkijoiden vähättely, puutteellinen tai harhaanjohtava raportointi, määrärahojen väärinkäyttö sekä kritiikittömyys tulosten tarkastelussa (Hirsijärvi ym. 2003, 27-28). Epärehellisyys ja toisaalta myös huolimattomuus tutkimusta tehtäessä johtavat helposti virheellisiin tutkimustuloksiin. Siksi on tärkeää, että tutkimuksen tuloksiin suhtaudutaan

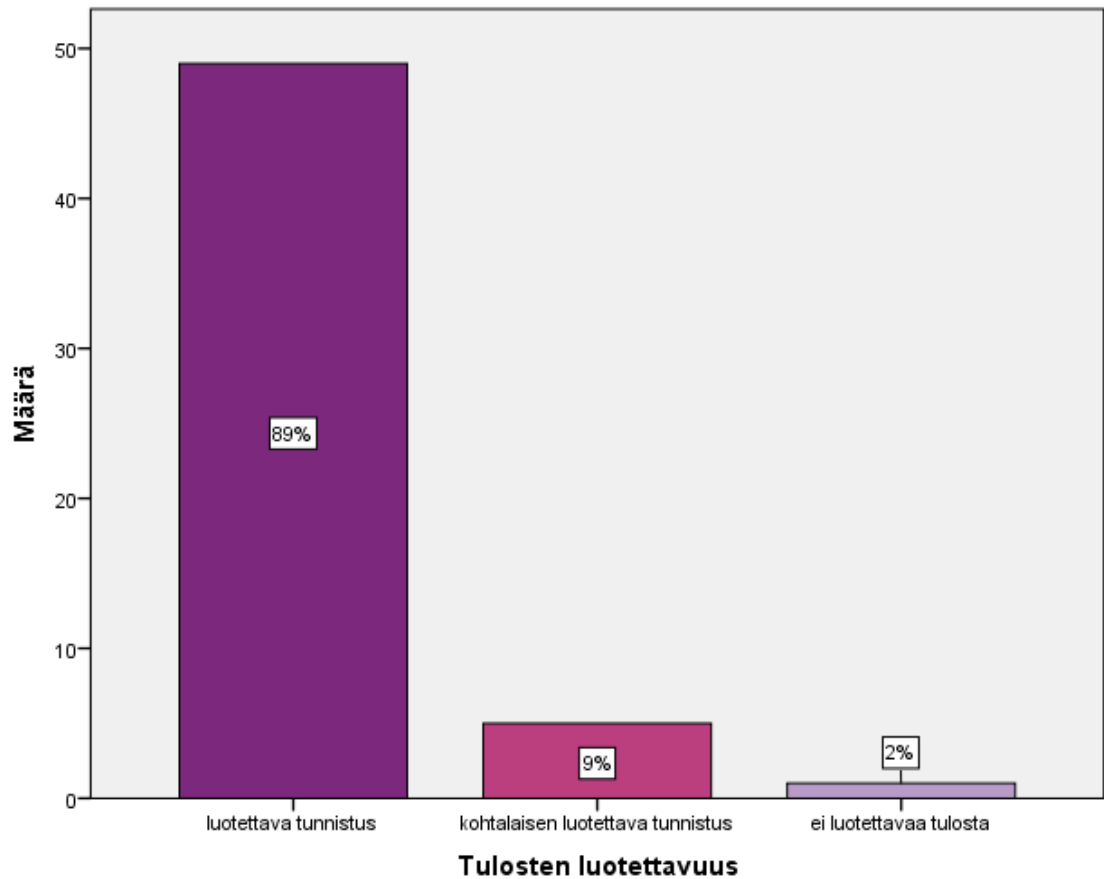
kriittisesti. (Mäkelä 1991, 117.) Tässä tutkimuksessa tulosten kriittinen tarkastelu on tärkeää tutkimuksen oikeellisuuden kannalta. Tulosten raportointi tehdään huolellisesti ja niin, että kaikki saadut koetulokset tuodaan rehellisesti julki. Toisten tekstien plagiointia vältetään lähdemerkintöjen asianmukaisella käytöllä.

## 5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

### 5.1 Tyypikantanäytteiden tulokset

Tutkimuksen tuloksia tarkastellaan niin, että potilasnäytteiden ja tyypikantojen tuloksia käsitellään erikseen, koska tyypikantoja ei ole analysoitu Vitek 2:lla ja pyrosekvensoimalla. Tyypikantanäytteistä saatuja tuloksia verrataan niiden tyypikantanimiin. Tyypikantojen (n = 55) analysoinnissa tarkoituksena oli selvittää saadaanko Brukerin MALDI-TOF MS:lla oikeita tuloksia tunnetuista viridans-ryhmän streptokokkikannoista. Tyypikannoissa oli mukana ryhmän ulkopuolisina verrokkeina myös muita streptokokkilajeja (Inka Harju, sähköpostiviesti 16.10.2012). Liitteen 2 taulukossa on esitetty kunkin analysoidun tyypikannan nimi, siitä Brukerin MALDI-TOF MS:lla saatu tulos ja sen luotettavuudesta kertova Maldi Biotyperin antama luotettavuusarvio eli score value (vastaavuuspisteet). Identifioinnin tulosta voidaan pitää todennäköisesti oikeana tunnistuksena vastaavuuspisteiden ollessa  $\geq 2$  (Bruker Daltonics GmbH 2011, 17).

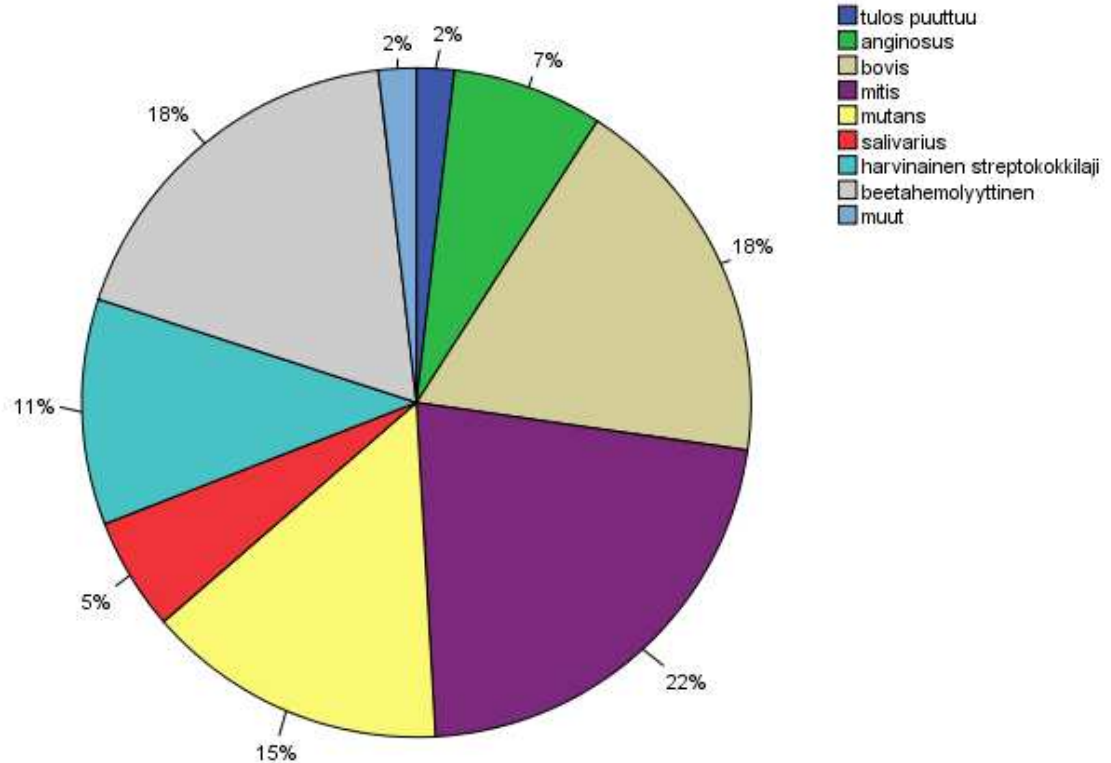
89 %:lle tyypikantojen isolaateista saatiin Maldi Biotyperin mukaan luotettava identifiointitulos ja viiden näytteen (9 %) tuloksen score value oli alle 2, mutta kuitenkin vähintään 1,7 eli tunnistus oli kohtalaisen luotettava. Yhdestä näytteestä (2 %) ei saatu lainkaan luotettavaa tulosta (kuvio 3).



Kuvio 3. Tyypikannoista Brukerin MALDI-TOF MS:lla saatujen tulosten luotettavuusarvio Maldi Biotyperin mukaan.

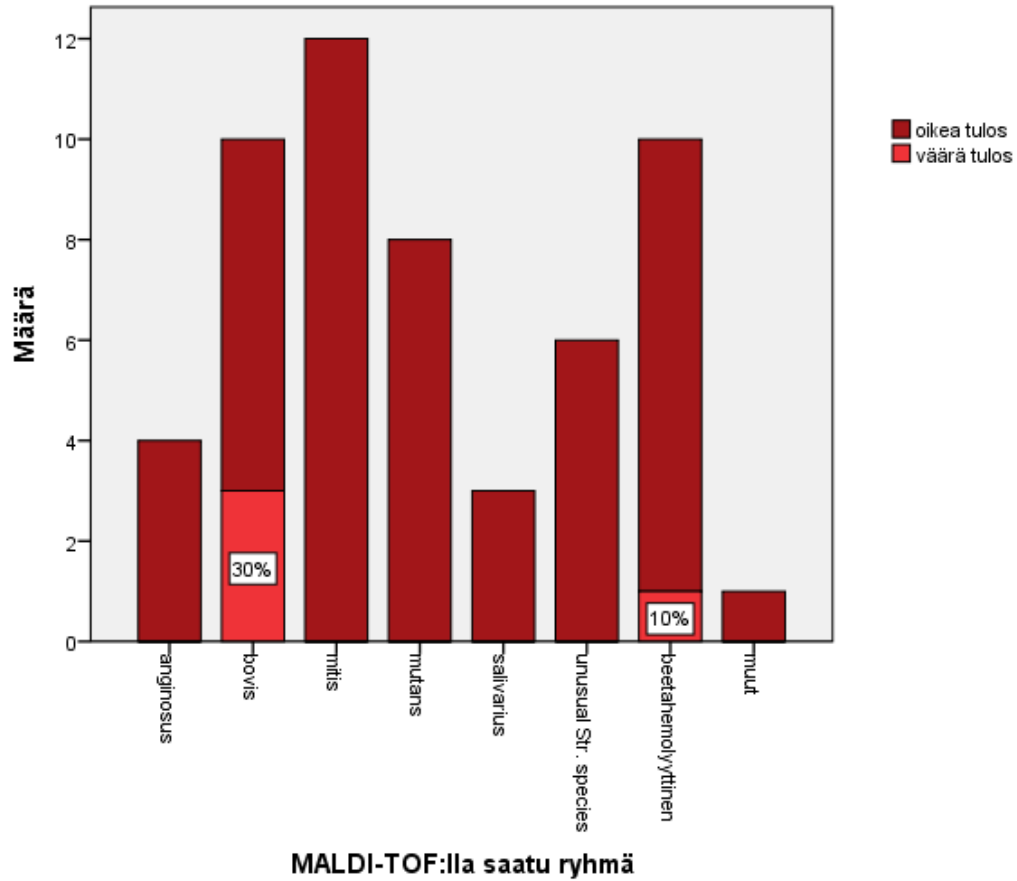
Tyypikannoista kaikki Brukerin MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset olivat ryhmätasolla oikeita. Kuviossa 4 esitetään tulosten jakautuminen streptokokkiryhmittäin. Kaikki analysoidut isolaatit eivät kuulu viridans-streptokokkeihin, vaan mukana on myös beetahemolyyttisiä kantoja ja yksi alfahemolyyttinen viridans-ryhmiin kuulumaton kanta (*S. suis*), joka on kuviossa ryhmässä "muut". Myös harvinaiset, ihmisellä esiintymättömät streptokokit on eritelty omaan ryhmäänsä.





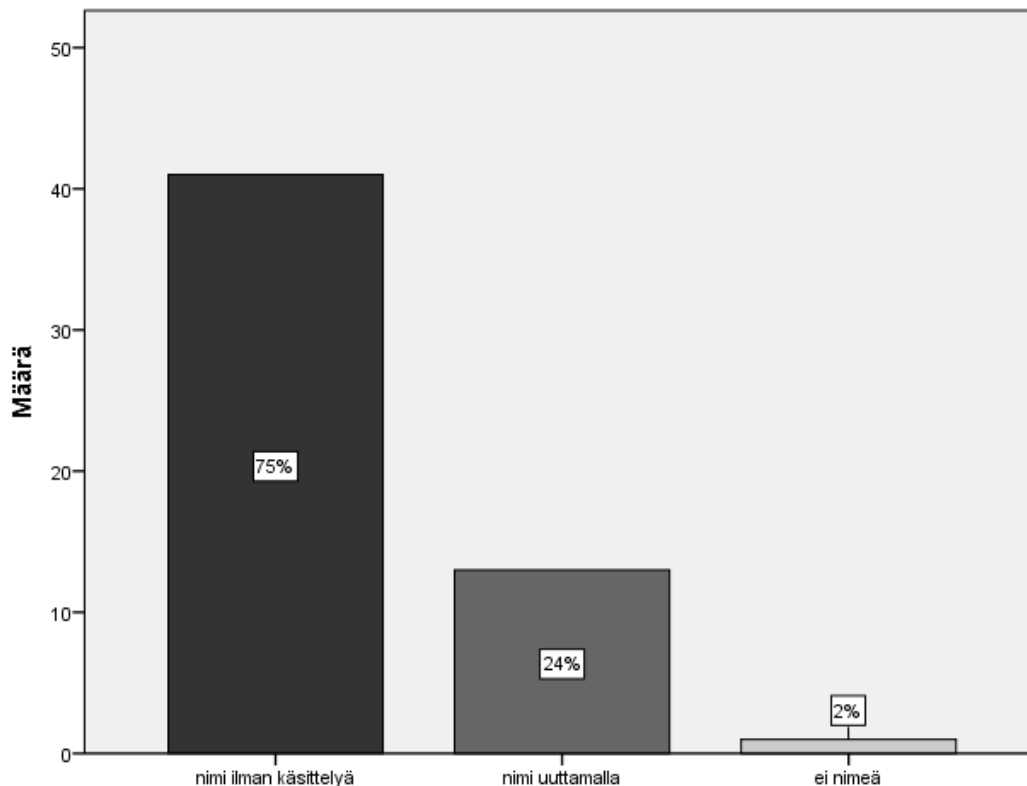
Kuvio 4. Tyypikannoista MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset jaoteltuna streptokokkiryhmittäin.

Identifiointituloksista 50 (91 %) oli täysin yhteneviä tyypikantojen kanssa, neljän (7 %) bakteeri-isolaatin ryhmä oli yhtenevä, mutta laji poikkesi tyypikannasta. Näiden neljän tuloksen score valuet olivat kuitenkin  $\geq 2$ , eli ne olivat Maldi Biotyperin mukaan luotettavia. Yhdestä (2 %) näytteestä ei saatu tulosta lainkaan. Kyseinen isolaatti oli beetahemolyyttisiin streptokokkeihin kuuluva *S. iniae*. Kuviosta 5 käy ilmi, että bovis-ryhmän bakteeri-isolaateista 70 % ja beetahemolyyttisistä isolaateista 90 % tunnistui lajitasolle oikein MALDI-TOF MS:lla. Muista ryhmistä kaikki isolaatit tunnistuivat oikeiksi lajeiksi.



Kuvio 5. MALDI-TOF MS:lla tyypikantanäytteistä saatujen tulosten oikeellisuus streptokokkiryhmittäin jaoteltuna.

Tyypikannoista 75 %:lle saatiin nimi ensimmäisellä analyysikerralla. 24 %:lle isolaateista saatiin nimi muurahaishappouuton avulla. Pikauutto ei vaikuttanut tulosten saamiseen. Kuviossa 6 on eritelty ilman uuttoa ja uuttamalla saatujen tulosten prosenttiosuudet sekä identifioimatta jäänyt kanta.



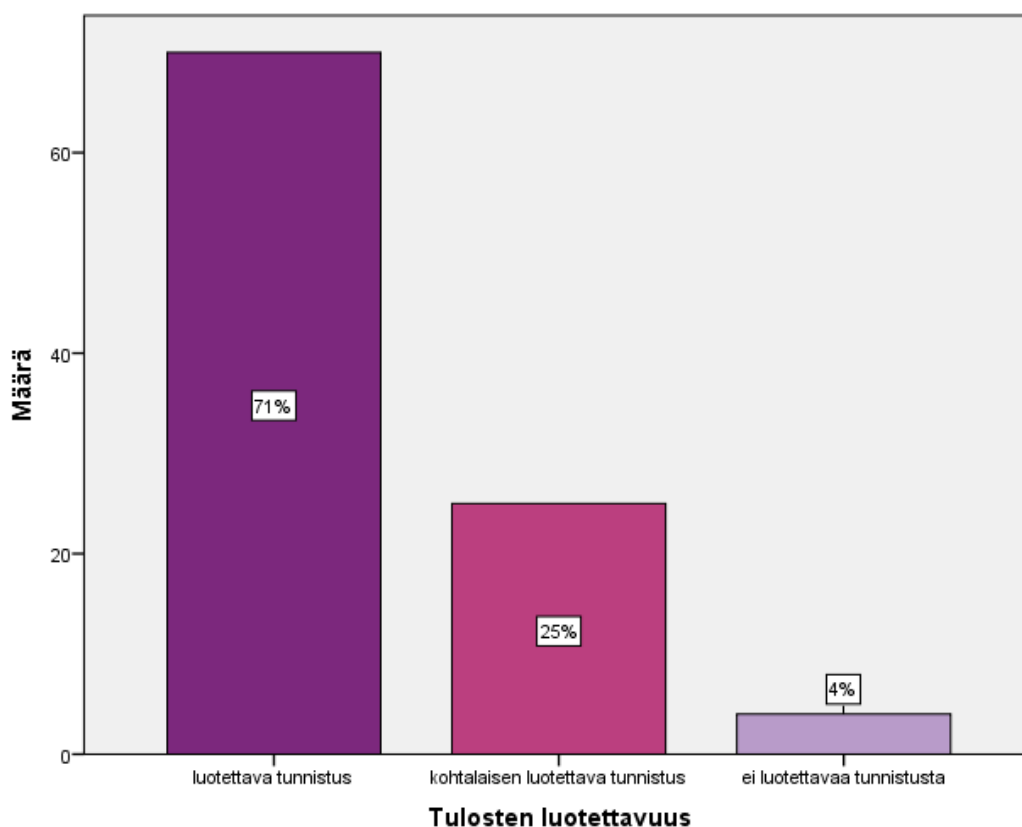
Kuvio 6. Muurahaishappouuton merkitys tuloksen saamiselle tyyppikantanäytteistä prosenttiosuuksina.

## 5.2 Potilasnäytteiden tulokset

Potilasnäytteiden (n = 99) analysoinnissa tarkoituksena oli selvittää saadaanko Brukerin MALDI-TOF MS:lla samoja tuloksia kuin pyrosekvensoinnilla ja Vitek 2:lla. Tutkimuksessa tarkastellaan erikseen molemmilla menetelmillä saatuja tuloksia verrattuna MALDI-TOF MS:lla saatuihin tuloksiin. Pyrosekvensointia pidetään luotettavimpana streptokokkien identifiointimenetelmänä, minkä vuoksi tämän tutkimuksen tuloksia verrataan pääasiassa pyrosekvensoinnilla saatuihin tuloksiin. Vitek 2:lla saadut tulokset ovat rinnastettavissa Brukerin MALDI-TOF MS:lla saatuihin tuloksiin eli niiden luotettavuus ei ole yhtä hyvä kuin pyrosekvensoinnin. Tämän vuoksi tutkimuksen kannalta oleellisempaa on keskittyä vertailussa pyrosekvensoinnin tuloksiin. Liitteen 3 taulukossa on

esitetty potilasnäytteistä MALDI-TOF MS:lla saatu nimi ja tuloksen luotettavuusarvio eli score value, pyrosekvensoinnilla saatu tulos ja Vitek 2:lla saatu tulos.

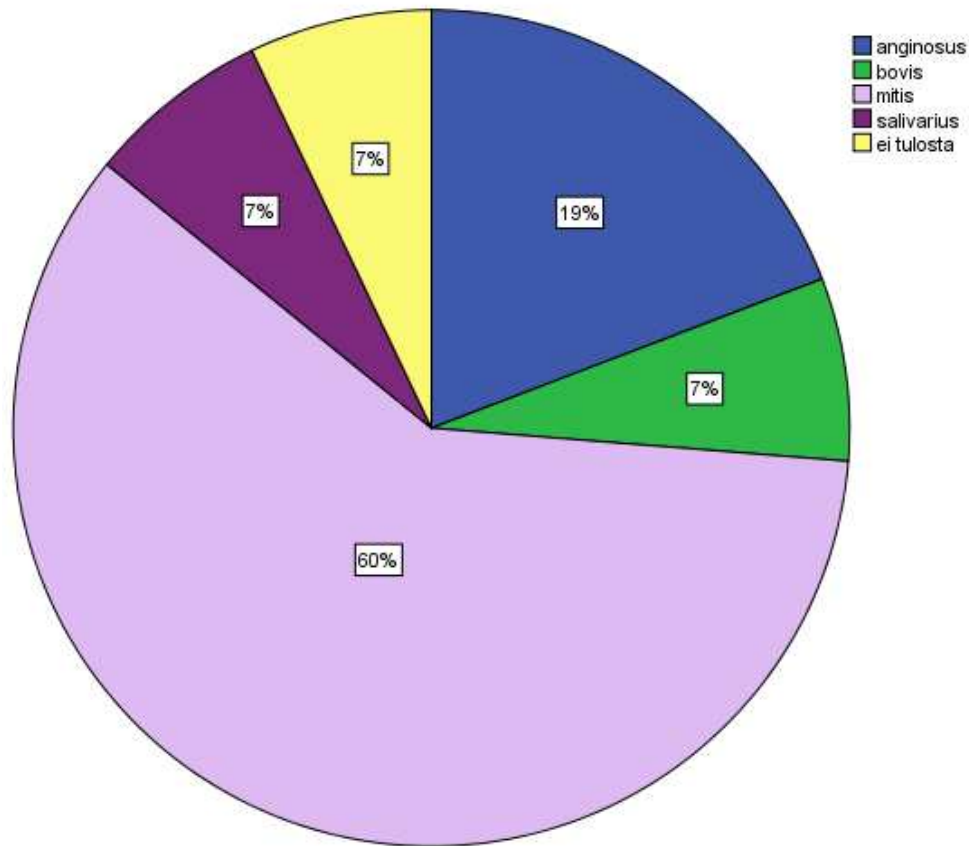
Potilasnäytteistä Brukerin MALDI-TOF MS:lla saaduista tuloksista 71 %:lla tulos oli Maldi Biotyperin mukaan luotettava eli sen score value oli  $\geq 2$ . Kohtalaisen luotettava tulos saatiin 25 % potilasnäytteistä ja neljälle prosentille ei saatu lainkaan luotettavaa tulosta (kuvio 7). Tyypikannoista saatuja luotettavia tuloksia oli 18 prosenttiyksikköä enemmän kuin potilaskannoista saatuja. Myös tuloksetta jääneitä kantoja oli potilasnäytteissä enemmän.



Kuvio 7. Potilasnäytteistä MALDI-TOF:lla saatujen tulosten luotettavuus.

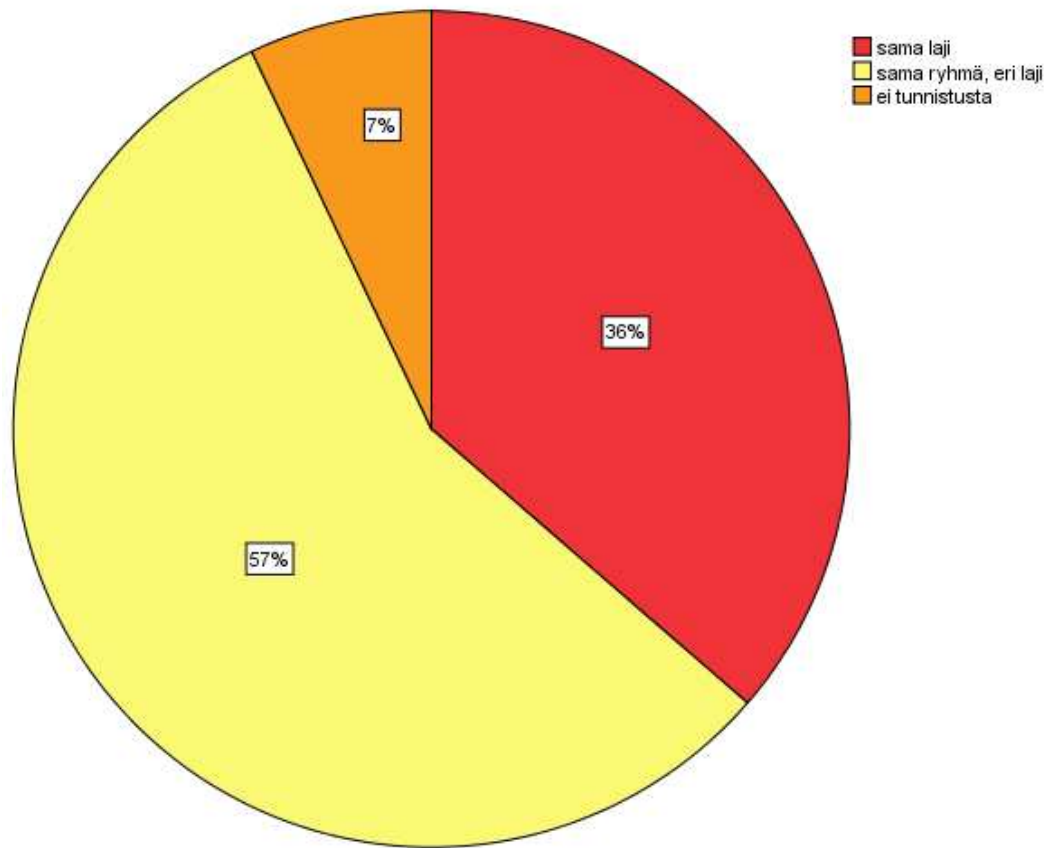
Analysoiduissa potilasnäytteissä ei ollut lainkaan beetahemolyyttisiä, mutans-ryhmään kuuluvia tai harvinaisia streptokokkilajeja kuten tyypikannoissa. 60 % identifioiduista potilasnäytteistä kuului mitis-ryhmään. Anginosus-ryhmään

kuului 19 % ja salivarius- ja mutans-ryhmiin 7 % näytteistä (kuvio 8). Seitsemälle prosentille ei saatu tulosta lainkaan tai saatiin tulos, jonka mukaan bakteeri-isolaatti ei ollut streptokokki.



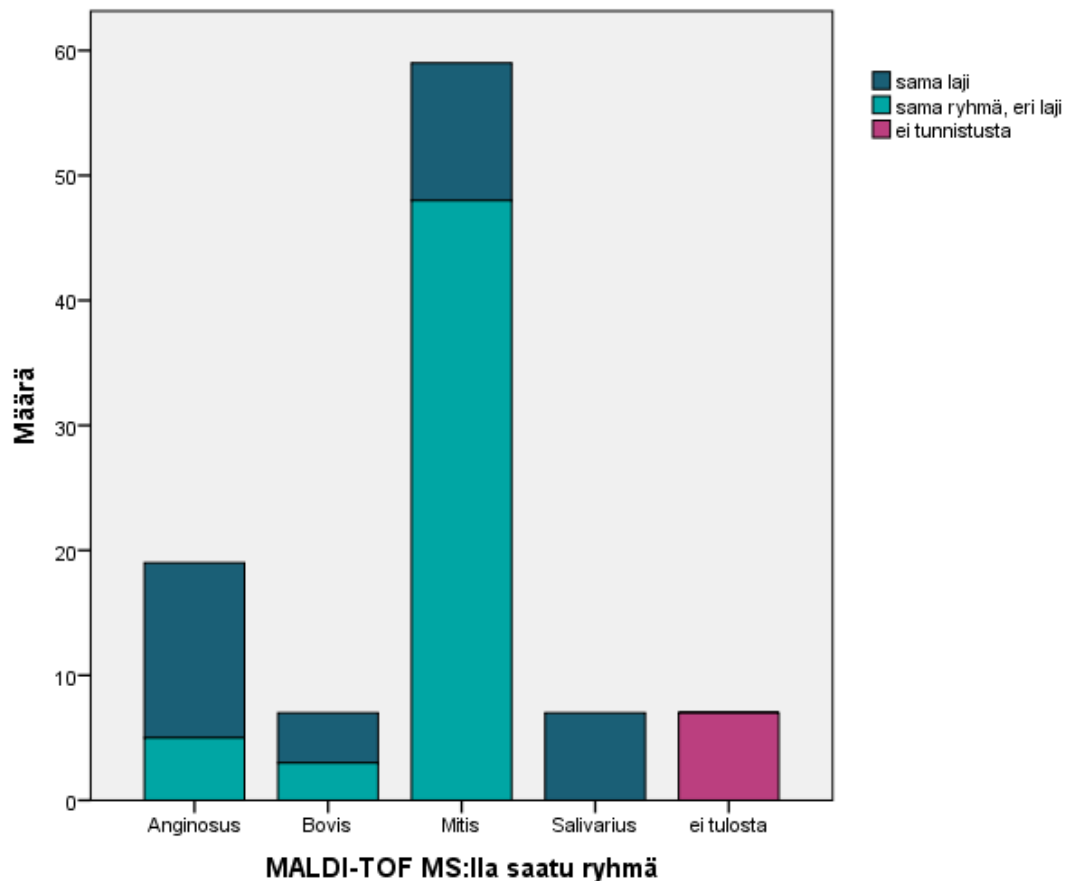
Kuvio 8. Potilasnäytteiden MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset jaoteltuna streptokokkiryhmittäin.

Kaikista potilasnäytteistä saatiin Brukerin MALDI-TOF MS:lla ryhmätasolla sama tulos kuin pyrosekvensoinnilla. 36 % näytteistä tunnistui molemmilla menetelmillä samaksi lajiksi ja 57 % eri lajiksi, mutta silti samaan ryhmään kuuluvaksi. Seitsemän prosenttia näytteistä jäi ilman tunnistusta (kuvio 9).



Kuvio 9. MALDI-TOF MS:lla saatujen tulosten vertailu pyrosekvensoinnilla saatuihin tuloksiin.

Kaikista salivarius-ryhmään kuuluvista identifioiduista potilasnäytteistä saatiin Brukerin MALDI-TOF MS:lla ja pyrosekvensoinnilla tulokseksi sama laji. Näytteitä, joista saatiin tulokseksi molemmilla menetelmillä sama ryhmä, mutta eri laji, oli yhteensä 57 % kaikista tutkituista. Ne jakautuivat streptokokkiryhmittäin niin, että 49 prosenttiyksikköä kuului mitis-ryhmään, 5 anginosus-ryhmään ja 3 bovis-ryhmään (kuvio 10).

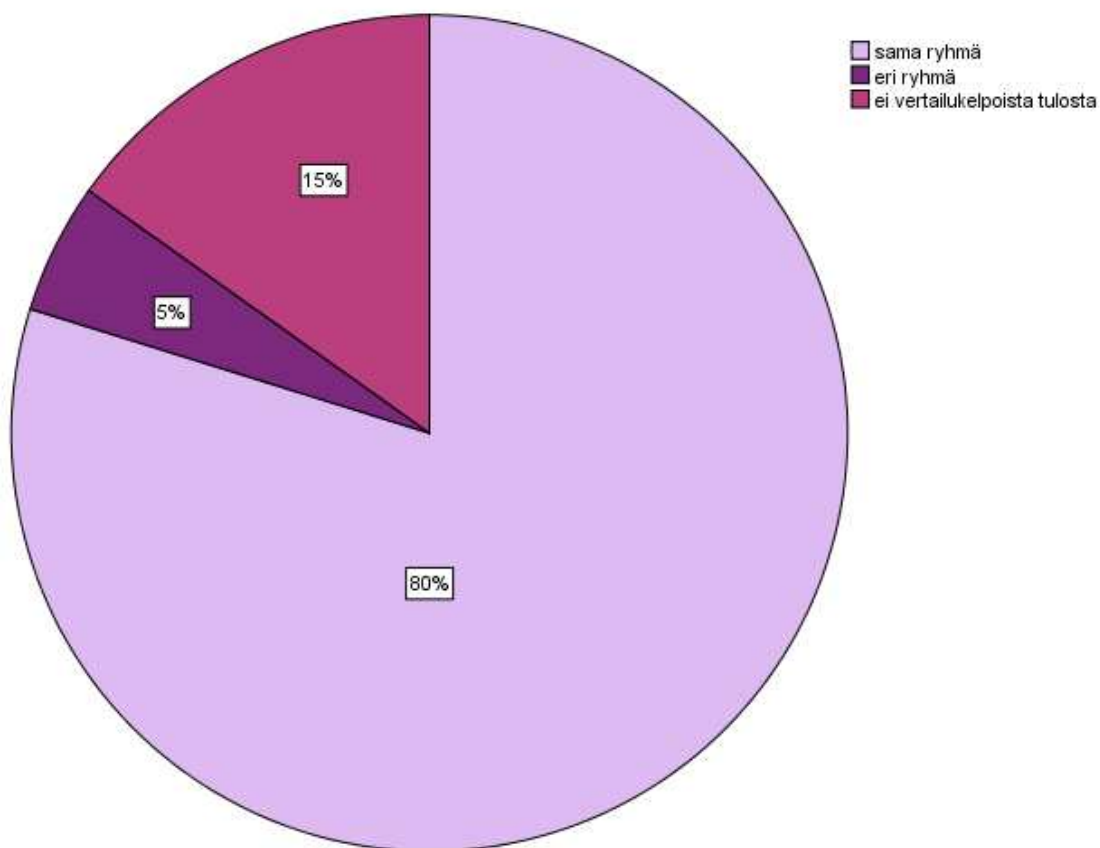


Kuvio 10. MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset ja niiden vertailu pyrosekvensoinnin tuloksiin jaoteltuna ryhmittäin.

Brukerin MALDI-TOF MS:lla identifioitui tutkituista potilasnäytteistä pneumokokiksi kaiken kaikkiaan 40 kantaa. Kantoja, joista saatiin MALDI-TOF MS:lla tulokseksi pneumokokki ja pyrosekvensoinnilla *S. pseudopneumoniae* oli 22 kappaletta. MALDI-TOF MS:lla virheellisesti pneumokokeiksi tunnistuneista 40 kannasta 12:lle Maldi Biotyper antoi identifioinnin luotettavuudeksi kohtalaisen arvon (score value 1.7-1.99) ja 28:lle luotettavan arvon (score value  $\geq 2$ ).

Vitek 2:lla saatujen tulosten vertailu Brukerin MALDI-TOF MS:lla saatuihin tuloksiin ei varsinaisesti anna tietoa streptokokkien identifioinnista, mutta tutkijat halusivat havainnollistaa näillä menetelmillä saatujen tulosten yhteneväsyyttä.

MALDI-TOF MS:n ja Vitek 2:n tulokset erosivat toisistaan enemmän kuin MALDI-TOF MS:n ja pyrosekvensoinnin tulokset. 80 % MALDI-TOF MS:lla saaduista identifiointituloksista oli ryhmätasolla samoja kuin Vitek 2:n tuloksista (kuvio 11). Kuviossa olevat 15 % kannoista, joista ei ole vertailukelpoista tulosta, pitävät sisällään ne kannat, joista ei ole saatu tulosta MALDI-TOF MS:lla, Vitek 2:lla tai kummallakaan edellämainituista menetelmistä.

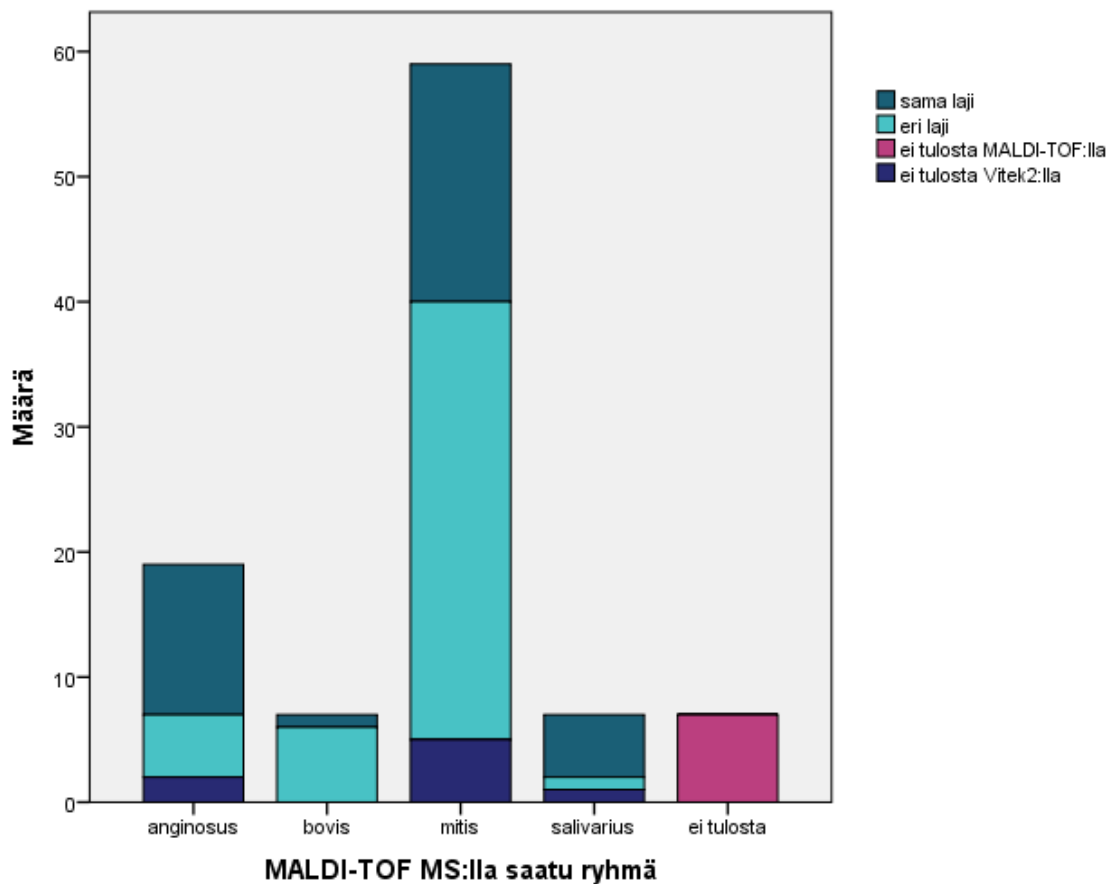


Kuvio 11. MALDI-TOF MS:lla saatujen tulosten vertailu Vitek 2:lla saatuihin tuloksiin ryhmätasolla.

Kuviosta 12 näkee, että bovis- ja mitis-ryhmän streptokokeista suurin osa on identifioitunut käytetyillä menetelmillä eri lajeiksi. Anginosus- ja salivarius-ryhmän streptokokeista taas suurin osa tunnistui samaksi lajiksi. 47 % kaikista



potilasnäytteistä identifioitui MALDI-TOF MS:lla ja Vitek 2:lla eri lajeiksi ja niistä 35 prosenttiyksikköä kuului mitis-ryhmään.



Kuvio 12. MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset ja niiden vertailu Vitek 2:n tuloksiin jaoteltuna ryhmittäin.

### 5.3 Tulosten tarkastelu

Tyypikannat identifioituivat Brukerin MALDI-TOF MS:lla hyvin, mikä oli odotettavissa, sillä tyypikantojen bakteerit edustavat lajeja tyypillisimmillään. Ryhmätasolla tyypikantanäytteet identifioituivat laitteella erittäin hyvin. Neljän tyypikantanäytteen, joista saatiin niiden tyypikantanimestä poikkeava tulos MALDI-TOF MS:lla, tuloksen score value oli  $\geq 2$ . Näin ollen kaikki Maldi

Biotyperin luotettaviksi luokittelemat tulokset eivät välttämättä ole oikeita. Tämä on otettava huomioon potilasnäytteitä analysoitaessa. Pikauutolla ei ollut merkitystä luotettavien tulosten saamiselle MALDI-TOF MS:lla. Tyypikannoista 75 %:lle saatiin nimi ensimmäisellä analyysikerralla ja 24 %:lle muurahaishappouuton avulla. Tämän perusteella voidaan todeta muurahaishappouutosta olevan hyötyä tulosten saamiseksi.

Potilasnäytteistä 71 %:lla tuloksen score value oli suurempi tai yhtä suuri kuin kaksi, 25 %:lla 1.700-1.999 ja neljälle prosentille näytteistä ei saatu lainkaan luotettavaa tulosta (kuvio 7). Maldi Biotyperin luotettavuusarvion mukaan tyypikantanäytteistä saatiin enemmän luotettavia tuloksia kuin potilasnäytteistä. Kantoja, joille ei saatu tulosta, oli potilasnäytteissä enemmän. Koska potilasnäytteiden bakteerikannat voivat erota hyvinkin paljon kyseisten lajien tyypillisistä kannoista, olikin odotettavissa, etteivät potilaskannat identifioitu yhtä hyvin kuin tyypikannat. Potilasnäytteissä ryhmien jakaantuminen on erilainen kuin tyypikantanäytteissä, koska potilasnäytteisiin ei ole valittu tiettyjä bakteereita. Niiden jakautuminen ryhmittäin (kuvio 8) kertoo siitä, miten yleisiä kunkin ryhmän streptokokit ovat bakteremian aiheuttajina.

Brukerin MALDI-TOF MS antoi kaikista potilasnäytteistä tulokseksi saman ryhmän kuin pyrosekvensointi. Tämän perusteella voidaan todeta, että MALDI-TOF MS tunnistaa viridans-streptokokit ryhmätasolla erinomaisesti. Viridans-ryhmän streptokokkien tunnistus on haasteellista ja MALDI-TOF MS:lla vain noin kolmannes identifioiduista potilasnäytteistä tunnistui oikeaksi lajiksi. Seitsemän prosenttia näytteistä jäi kokonaan ilman tunnistusta. Tutkijoiden mielestä näytteet tunnistuivat lajitasolla melko huonosti ja MALDI-TOF MS:n käyttäminen viridans-ryhmän streptokokkien tunnistamiseen kliinisessä potilastyössä voidaan asettaa kyseenalaiseksi.

Pneumokokki kuuluu mitis-ryhmään, jossa oli kaikkein eniten vaihtelua pyrosekvensoinnin ja Brukerin MALDI-TOF MS:lla saatujen tulosten lajitason tunnistuksessa. Koska koko potilasnäyteaineistosta 60 % oli mitis-ryhmään kuuluvia kantoja, suuri osa kaikista tuloksista tunnistui lajitasolla väärin. Pyrosekvensoinnilla ei kyetty kaikissa tapauksissa erottamaan toisistaan S.

mitistä, *S. pneumoniae* ja *S. pseudopneumoniae*. Jatkotutkimuksissa kaikilta näiltä kannoilta todettiin löytyvän pneumokokeille epätyypillinen emäs, minkä perusteella niitä voidaan pitää *S. pseudopneumoniae* -kantoina (Inka Harju, sähköpostiviesti 16.10.2012). Aineistosta ei saatu pyrosekvensoinnilla tulokseksi yhtään pneumokokkia. Maldi Biotyper antoi 28:lle pneumokokiksi virheellisesti identifioituneelle näytteelle luotettavan tunnistusarvon ja kahdelletoista näytteelle kohtalaisen luotettavan arvon. Tuloksista voidaan päätellä, että mitis-ryhmän streptokokit identifioituvat MALDI-TOF MS:lla usein virheellisesti *S. pneumoniaeksi*, eikä tulosta voida pitää luotettavana, vaikka sen score value olisi  $\geq 2$ . Tuloksista ei voida päätellä mitään siitä, miten hyvin *S. pneumoniae* tunnistuu MALDI-TOF MS:lla, koska potilasaineistossa ei ollut mukana yhtään lajin edustajaa. Maldi Biotyperin tutkimuksessa käytetyssä tietokantaversiossa on vain yksi *S. pseudopneumoniae* -kanta, minkä vuoksi laite ei välttämättä tunnista kyseistä lajia.

MALDI-TOF MS:lla ja Vitek 2:lla potilasnäytteistä saatuja tuloksia vertailtaessa vaihtelua oli myös ryhmätasolla toisin kuin tyyppikantanäytteissä tai pyrosekvensointiin verrattaessa. Menetelmillä saatiin tulokseksi sama laji 47 %:lle näytteistä. Sekä MALDI-TOF MS:n että Vitek 2:n tuloksia olisi verrattava pyrosekvensointiin, jotta voitaisiin päätellä kummasta menetelmästä tulosten erot johtuvat. Tämän tutkimuksen tarkoituksena ei kuitenkaan ole verrata Vitek 2:lla saatuja tuloksia pyrosekvensoinnin tuloksiin.

## 6 POHDINTA

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli identifioida viridans-ryhmän streptokokkeja Brukerin MALDI-TOF MS –laitteella ja verrata tyypikantanäytteistä saatuja tuloksia niiden tyypikantanimiin sekä potilasnäytteiden tuloksia aiemmin samasta aineistosta pyrosekvensoinnilla ja Vitek 2:lla saatuihin tuloksiin. Tutkimuksessa oli tarkoitus myös verrata tuloksia Lahden klinisen mikrobiologian osaston saamiin tuloksiin, mutta kyseisiä tuloksia ei saatu tämän tutkimuksen tekijöiden käyttöön sopivassa aikataulussa. Vertailu tehtiin TYKSLABin klinisen mikrobiologian osastolla tästä tutkimuksesta erillään. Tutkimuksen aikana todettiin, että MALDI-TOF MS:lla ja Vitek 2:lla saatujen tulosten vertaaminen toisiinsa ei ollut keskeistä, koska ei tiedetä kummalla laitteella saatu tulos on oikea. Tämän vuoksi vertailu näiden kahden menetelmän välillä jätettiin suppeaksi ja tutkittiin ainoastaan sitä, saatiinko menetelmillä samoja tuloksia, puuttumatta siihen olivatko ne oikeita. Pyrosekvensoinnilla ja Vitek 2:lla kyseisistä potilasnäytteistä saatuja tuloksia ei vertailtu keskenään, koska se kuului Haanperän ym. (2007) tekemään tutkimukseen. Tyypikantanäytteiden osalta tutkimus eteni tarkoituksenmukaisesti.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää tunnistaako MALDI-TOF MS viridans-ryhmän streptokokkeja ja kuinka luotettavia identifioinnin tulokset todellisuudessa ovat. Erityisesti tavoitteena oli selvittää erottaako laite *S. pneumoniae* muista viridans-ryhmän streptokokeista. MALDI-TOF MS tunnisti ryhmätasolla viridans-ryhmän streptokokit erittäin hyvin. Vain muutamasta isolaatista ei saatu lainkaan nimeä ja kaikki tyypikannoista ja potilasnäytteistä saadut tulokset olivat ryhmätasolla samat kuin niiden tyypikantanimet tai pyrosekvensoinnilla saadut tulokset. Lajitasolla tulokset vaihtelivat melko paljon ja eniten hajontaa oli mitis-ryhmässä. Pyrosekvensoinnin perusteella potilasnäytteissä ei ollut yhtään pneumokokkia, mutta MALDI-TOF MS identifioi virheellisesti 40 isolaattia *S. pneumoniae*ksi. *S. pneumoniae* ja muiden mitis-ryhmän streptokokkien identifiointi MALDI-TOF MS:lla ei tämän perusteella ole

lajitasolla luotettavaa. Muissa streptokokkiryhmissä tulokset olivat kohtalaisen luotettavia. Voidaankin pohtia, onko MALDI-TOF MS:n käyttäminen kliinisessä potilastyössä järkevää, koska viridans-ryhmän streptokokit kyllä tunnistuvat ryhmätasolla oikein, mutta lajitason tunnistukseen ei voi juurikaan luottaa. Koska mukana potilasnäytteissä ei ollut ainoatakaan *S. pneumoniae* -kantaa, ei voida arvioida kuinka hyvin laite tunnistaa pneumokokin. Tyyppikannoissa olleen yhden pneumokokkikannan laite kuitenkin tunnisti oikein.

Tutkimuksesta saatiin selville minkä viridans-ryhmän streptokokkien identifiointiin MALDI-TOF MS soveltuu eli minkä ryhmien ja lajien tuloksiin voidaan luottaa todellisia potilasnäytteitä analysoitaessa. Tutkijoiden mielestä pneumokokkia epäiltäessä laitetta ei tule käyttää identifiointiin, vaan on käytettävä muita menetelmiä. Jos ryhmätason identifikaatio riittää tai halutaan lajin nimi kun kyseessä ei ole mitis-ryhmän streptokokki, voidaan laitetta tutkijoiden mielestä käyttää edellyttäen, että tulosta arvioidaan kriittisesti. Inka Harjun (2012b) mukaan MALDI-TOF MS ei sovellu rutiinikäyttöön viridans-ryhmän streptokokkien identifiomisessa, koska ne tunnistuvat menetelmällä epäluotettavasti. Ainoastaan pienipesäkkeiset beetahemolyyttiset ja/tai toffeehajuiset kannat, joita epäillään anginosus-ryhmän streptokokeiksi, kannattaa Harjun (2012b) mukaan analysoida MALDI-TOF MS:lla.

Tämän tutkimuksen tulokset olivat samansuuntaisia aiemmin streptokokkien identifiointista tehtyjen tutkimusten tulosten kanssa. Myös Haanperä ym. (2007) totesivat, että ryhmätasolla streptokokit tunnistuivat huomattavasti paremmin kuin lajitasolla ja mitis-ryhmän streptokokkien identifiomisessa oli vaikeuksia. Samoin Ikryannikova ym. (2011) havaitsivat eri menetelmillä saatujen tulosten eroavan toisistaan huomattavasti identifioidessaan alfa-hemolyyttisiä streptokokkeja MALDI-TOF MS:lla ja MLSA-menetelmällä.

Suosittelava havaintoyksiköiden vähimmäismäärä kvantitatiivisessa tutkimuksessa on 100 ja tässä tutkimuksessa käytettävän aineisto koko on 154 bakteeri-isolaattia eli yli suositeltavan määrän (Vilka 2007, 13). Näin ollen tutkimusta voidaan pitää luotettavana aineiston koon osalta. Aineistosta lähes kaksi kolmasosaa oli potilasnäytteitä, mikä lisää tulosten luotettavuutta, koska

kliinisessä potilastyössä analysoidaan vastaavia näytteitä. Näytteet viljeltiin huolellisesti ja sekä viljelyssä että aineiston analysoinnissa käytettiin jokaisella näytteellä samaa protokollaa. Näytteet identifioitiin rinnakkaisina, millä voitiin lisätä mahdollisen kontaminaation huomaamista. Saatuja tuloksia arvioitiin kriittisesti ennen tuloksen käyttöä tutkimuksessa. Vertaaminen pyrosekvensoinnin ja Vitek 2:n tuloksiin aiheuttaa virheen mahdollisuuden, koska ei olla varmoja siitä kummalla menetelmällä saatu tulos on oikea. Tutkimuksessa keskityttiin pyrosekvensoinnin tuloksiin vertaamiseen, koska siitä saatuja tuloksia voidaan pitää melko luotettavina. Tutkimuksen validiteetti varmistettiin käyttämällä tunnettuja streptokokkikantoja ja juuri sitä laitetta, jonka identifiointikykyä tutkittiin. Tutkimuksen reliabiliteetti on korkea, koska kahden eri tutkimuksen lopputulos olisi todennäköisesti sama. Tutkimuksen tulos on, että MALDI-TOF MS:lla voidaan saada viridans-ryhmän streptokokeista tulokseksi eri lajeja eri analysointikerroilla ja se ei ole luotettava niiden identifioimisessa. Tutkimustulos oli odotettavissa laitteen aiemman käytön perusteella.

Koska tämän tutkimuksen aineistossa ei ollut mukana yhtään potilasnäytteestä eristettyä *S. pneumoniae* -kanta, voisi olla tarpeen tutkia vastaavalla tavalla minkälaisia tuloksia MALDI-TOF MS:lla saataisiin aineistosta, joka sisältäisi pneumokokkikantoja. Lopputulos todennäköisesti olisi samansuuntainen tämän tutkimuksen tulosten kanssa. Myös tutkimus, jonka otoskoko olisi tämän tutkimuksen otoskokoa suurempi ja joka keskittyisi vain mitis-ryhmän streptokokkikantojen identifiointiin MALDI-TOF MS:lla, voisi olla hyödyllinen. Koska tässä tutkimuksessa ei alkuperäisestä tarkoituksesta huolimatta päästy vertailemaan eri valmistajien MALDI-TOF MS -laitteiden identifiointituloksia, olisi tämä yksi mahdollinen jatkotutkimusaihe. Wernon ym. (2012) mukaan *S. pneumoniae* on mahdollista erottaa MALDI-TOF MS:lla muista mitis-ryhmän streptokokeista analysoimalla laitteen tuottamia piikkejä (peak). Tämä ei sellaisenaan vielä sovellu rutiinikäyttöön kliinisessä laboratoriossa aiheen vähäisen tutkimuksen vuoksi, mutta tarjoaa jatkotutkimusmahdollisuuksia.

## LÄHTEET

American Society of Microbiology 2005. Microbe Library. Viitattu 29.10.2012  
<http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/114-10.jpg>

Aslanzadeh, J. 2010. Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. Teoksessa Tang, Y-W. & Stratton C. W. (toim.). Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. USA: Springer, 84-116.

Barsotti, O., Décoret, D. & Renaud, F.N.R. 2002. Identification of streptococcus mitis group species by RFLP of the PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacer. Research in Microbiology 153 (2002), 687-691. Viitattu 1.10.2012  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250802013827>

Biomerieux, Inc. 2006. Vitek®2 Product information. USA.

Bruker Daltonics GmbH 2011. Maldi Biotyper 3.0 User Manual – Software for Microorganism Identification and Classification. 2. painos. Saksa.

Bruker Daltonics GmbH 2004. Maldi Theory. Mass spectrometry. Saksa.

Clarkeburn, H. & Mustajoki, A. 2007. Tutkijan arkipäivän etiikka. Tampere: Vastapaino.

Dare, D. 2010. Rapid Bacterial Characterization and Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Teoksessa Tang, Y-W. & Stratton C. W. (toim.). Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. USA: Springer, 84-116.

Doern, C. D. & Burnham, C.-A. D. 2010. It's Not Easy Being Green: the Viridans Group Streptococci, with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations. Journal of clinical microbiology, Nov. 2010, p. 3829–3835. Viitattu 19.9.2012  
<http://jcm.highwire.org/content/48/11/3829.full.pdf+html>

Ehder, T. (toim.) 2005. Mikrobiologiset vertailukannat. MIKES julkaisu J1/2005. Viitattu 11.9.2012  
[http://www.mikes.fi/documents/upload/j1\\_05\\_mikrobiologiset\\_kantakokoelmat.pdf](http://www.mikes.fi/documents/upload/j1_05_mikrobiologiset_kantakokoelmat.pdf)

Ericson, E & Ericson, T. 2007. Klinisk mikrobiologi: infektioner, immunologi, sjukvårdshygien. 3. painos. Slovenien, Ljubljana: Liber Ab.

Facklam, R. 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 15, No. 4/2002, 613-614.

Haanperä, M., Jalava, J., Huovinen, P., Meurman, O. & Rantakokko-Jalava, K. 2007. Identification of Alpha-Hemolytic Streptococci by Pyrosequencing the 16S rRNA Gene and by Use of VITEK 2. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2007, 762–770. Viitattu 15.4.2012  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1829103/pdf/1342-06.pdf>

Han X.Y. 2010. Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. Teoksessa Tang, Y-W. & Stratton C. W. (toim.). Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. USA: Springer, 323-332.

Harju, I. 2012a. Streptokokkien vastaaminen 12.3.2012. Power point –esitys.

Harju, I. 2012b. Viridans-streptokokkitutkimus Maldilla 01.10.2012. Power point –esitys.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P 2003. Tutki ja kirjoita. 6.-9. painos. Helsinki: Tammi.

Huovinen, P., Vaara, M., Liippo, K. & Viljanen, M. 2003. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.). *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Kirja II. 1.painos. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim, 81-151.

Ikryannikova L.N., Lapin K.N., Malakhova M.V., Filimonova A.V., Ilina E.N., Dubovickaya V.A., Sidorenko S.V. & Govorun V.M. 2011. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 11, No. 7, 1709-1715. Viitattu 9.4.2012

<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.turkuamk.fi/science/article/pii/S1567134811002656>

Justesen, U. S., Holm, A., Knudsen, E., Bisgaard Andersen, L., Jensen, T. G., Kemp, M., Skov, M. N., Gahrn-Hansen, B. & Møller, J. K. 2011. Species Identification of Anaerobic Bacteria: a Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 49, No. 12, 4314-4318. Viitattu 24.10.2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232989/pdf/zjm4314.pdf>

Kauma, H. & Virolainen-Julkunen, A. 2010. Pneumokokki. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.). *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 112-121.

Koivisto, J. 2012. Orgaaninen rakenneanalytiikka. Luentomoniste. Viitattu 24.10.2012 <https://noppa.aalto.fi/noppa/kurssi/ke-4.4100/materiaali>

Lindholm, L. & Eerola, E. 2010. Bakteerien luokittelu ja tyypittäminen. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.). *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 56-67.

Mäkelä, P. H. 1991. Epärehellisyys ja vilppi tutkimuksessa. Teoksessa Löppönen, P., Mäkelä, P. H. & Paunio, K. (toim.) *Tiede ja etiikka*. Juva: WSOY, 117-125.

Rantakokko-Jalava, K. & Anttila, V.-J. 2010. Muut streptokokit, enterokokit ja muita grampositiivisia kokkeja. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.). *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 122-129.

Scholz, C. F. P., Poulsen, K. & Kilian, M. 2012. Novel Molecular Method for Identification of *Streptococcus pneumoniae* Applicable to Clinical Microbiology and 16S rRNA Sequence-Based Microbiome Studies. *Journal of clinical Microbiology*. Vol. 50, No 6, 1968-1973.

Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J.M. & Raoult, D. 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* Vol. 49, 2009, 543-544.

Soininen, M. 1995. Tieteellisen tutkimuksen perusteet. Turku: Turun yliopiston täydennyskoulutuskeskus.

TYKSLAB klininen mikrobiologia 2012. Työohje: Bruker MALDI Biotyper:n käyttöohje.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Welker, M. & Moore, E.R.B. 2011. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 34, 2-11.

Werno, A. M., Christner, M., Anderson, T. P. & Murdoch, D. R. 2012. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal *Streptococci* of the *Streptococcus mitis*



Group by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 50, No. 9, 2863-2867.

Wessels, E., Schelfaut, J. J. G., Bernardis, A. T. & Claas, E. C. J. 2012. Evaluation of Several Biochemical and Molecular Techniques for Identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and Their Detection in Respiratory Samples. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 50, No. 4, 1171-1177.

Westling, K., Julander, I., Ljungman, P., Vondracek, M., Wretling, B. & Jalal S. 2007. Identification of species of viridans group streptococci in clinical blood culture isolates by sequence analysis of the RNase P RNA gene, *rnpB*. *Journal of infection* (2008) 56, 204-210.

Zbinden, A., Köhler, N. & Bloemberg, G. V. 2010. *recA*-Based PCR Assay for Accurate Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Other Viridans Streptococci. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 49, No. 7, 523-527. Viitattu 1.10.2012  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3043496/>

# Tutkimuslupahakemus

VARSAINAI-SUOMEN SAIRAANHOITOPIIRI  
Egentliga Finlands Sjukvårdsdistrikt

HOITOTYÖN TUTKIMUS- JA OPINNÄYTETYÖ

Nro \_\_\_\_\_

LUPAHAKEMUS (katso erilliset ohjeet: <http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus>)

Hakemus lähetetään: VSSHP, TYKS, Hoitotyön toimisto, suunnittelija, PL 52, 20521 TURKU

☒ Uusi tutkimus

☐ Jatko/Muutos lupa

TUTKIMUSLUVAN HAKIJA/ HAKIJAT	Nimi/nimet: Saija Vahanne Saana Viertomanner	
	Osoite: Murkionkatu 22 C 10 <sup>th</sup> , 20740 Turku / Helsingintie 13 A4, 24100 Salo	
Opiskelu- tai työpaikka	puhelin: 040-7303606 / 050-4917312 sähköposti: svahanne@gmail.com / saana.viertomanner@students.turkuamk.fi	
	Turun ammattikorkeakoulu, Ruiskate, bioanalyyttikan ko.	
Opinnäytetyö	<input type="checkbox"/> Väitöskirja <input type="checkbox"/> Pro gradu <input checked="" type="checkbox"/> Opinnäytetyö/AMK <input type="checkbox"/> muu, mikä? _____ <input type="checkbox"/> Lisensiaattityö <input type="checkbox"/> Ylempi AMK	
TUTKIMUKSEN/OPINNÄYTETYÖN TIIVISTETTY KUVAUS (mm. tutkimuksen nimi, päätaulotteet, menetelmät, aineisto, tutkimuksen suorituspaikka, tutkimuksen merkitys)	<p>Liite: alustava tutkimussuunnitelma</p> <p>Tutkimuksen nimi: Viridans-ryhmän streptokokkikantojen identifiointi MALDI-TOF -laitteella (Bruker)</p> <p>Vertaamme saamiamme tuloksia Lahden kliinisen mikrobiologian laboratoriossa eri valmistajan vastaavalla laitteella (BioMerieux) saatuihin tuloksiin sekä samoista näytteistä eri menetelmillä saatuihin tuloksiin.</p> <p>Toimeksiantajana ja tutkimuksen suorituspaikkana on TYKSLABin kliinisen mikrobiologian laboratorio (os. 938). Tutkimusaineiston koko on noin 150 näytettä ja se saadaan toimeksiantajalta.</p> <p>Viridans-streptokokkien tunnistus on ongelmallista muuttuneen taksonomian ja epäselvien lajirajojen vuoksi. Tutkimuksen tarkoituksena on tuloksia vertaamalla selvittää MALDI-TOF-laitteella tehtävän identifiointin tulosten oikeellisuutta ja selvittää miten hyvin menetelmällä voidaan tunnistaa viridans-streptokokit.</p>	
TUTKIMUKSEN OHJAAJA(T)	3.4.2012 <u>K. Rantamäki-Jalava</u> allekirjoitus/nimen selvitys 4.4.2012 <u>Seija Kirrko-Jaakkola</u> allekirjoitus/nimen selvitys	
YHTEYSTIEDOT		
SITOUMUS JA JULKAISULUPA	Sitoudun noudattamaan hyvää tutkimuskäytäntöä, sairaalan yleisiä sääntöjä sekä vaitiolovelvollisuutta ( <a href="http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/1071/">http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/1071/</a> , <a href="http://www.turkucrc.fi">www.turkucrc.fi</a> ). 3.4.2012 <u>Saana Viertomanner</u> hakijan allekirjoitus/nimen selvitys 3.4.2012 <u>Saija Vahanne</u> hakijan allekirjoitus/nimen selvitys	
YLIHOITAJAN LAUSUNTO JA YHDYSHENKILÖN NIMEÄMINEN VSSHP:ssä	Klinikan/yksikön kehittämishanke, johon opinnäytetyö/tutkimus liittyy: _____ Yhdyshenkilö/virkan/toimen nimike: _____ (yh nimeää) Puollan <input type="checkbox"/> En puolla <input type="checkbox"/> Ylihoitaja(t) <u>1</u> _____ allekirjoitus/nimen selvitys <u>1</u> _____ allekirjoitus/nimen selvitys	
HOITOTYÖN ASiantuntijaryhmän lausunto	<input type="checkbox"/> Lupaa puoletaan <input type="checkbox"/> Ei puoleta, Perustelu (tarv. liitteenä) <input type="checkbox"/> Pyydetään lähettämään eettiselle toimikunnalle <u>1</u> _____ allekirjoitus/nimen selvitys <input type="checkbox"/> Pyydetään lisäselvityksiä: _____	
EETTINEN TOIMIKUNTA	Eettisen toimikunnan lausunto saatu (liitteenä) <u>1</u> _____	
TUTKIMUSLUVAN MYÖNTÄMINEN	<input checked="" type="checkbox"/> Myönnetty <input type="checkbox"/> Ei myönnetty 16.4.2012 <u>Benita Palo-L</u> allekirjoitus/nimen selvitys VSSHP:n/sairaalan nimen saa julkaista tutkimusraportissa/opinnäytetyössä Kyllä <input type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/> Haluan nähdä tutkimusraportin/opinnäytetyön ennen julkaisuluvan antoa Kyllä <input type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/>	
	Päätös annettu tiedoksi hakijalle <u>1</u> _____ Päätöksen antoi _____	

## Tyypikantanäytteiden nimet ja MALDI-TOF MS:lla saadut tulokset

NRO	ID	tyypikannan nimi (Str.)	Maldilla saatu nimi (Str.)	arvo	ryhmä sama, eri laji
1	43820	* infantarius	lutetiensis	2.080	x
2	15886	* equi	equi	2.242	
3	16030	* zoo-epidemicus	equi	2.465	
4	15890	canis	canis	2.332	
5	8518	bovis	equinus	2.007	x
6	13593	thoraltensis	thoraltensis	2.268	
7	9465	uberis	uberis	2.273	
8	11878/20560	salivarius	salivarius	2.163	
9	6778	parasanguinis	parasanguinis	2.047	
10	27303	iniae			
11	6777/25608	gordonii	gordonii	2.086	
12	7984	suis	suis	2.099	
13	19649	urinalis	urinalis	2.261	
14	45919	australis	australis	1.910	
15	46377	constellatus * pharyngis	constellatus	2.354	
16	45419	didelphis	didelphis	2.233	
17	36637	dysgalactiae * equisimilis	dysgalactiae	2.387	
18	19174	ovis	ovis	2.093	
19	24891/20627	oralis	oralis	1.844	
20	17826	sanguinis	sanguinis	2.188	
21	#0059	sinesis	sinesis	2.430	
22	20573	intermedius	intermedius	1.903	
23	12643	mitis	pneumoniae	2.172	x
24	47831	infantarius * coli	lutiensis	2.231	x
25	46150	gallolyticus * pasteurianus	gallolyticus	2.305	
26	15097	macacae	macacae	2.017	
27	44616	entericus	entericus	2.149	
28	14579	hyointestinalis	hyointestinalis	2.414	
29	14710	hyovaginalis	hyovaginalis	2.283	
30	15572	gallolyticus	gallolyticus	2.458	
31	18488	gallolyticus * macedonicus	gallolyticus	2.065	
32	14177	pluranimalium	pluranimalium	2.332	
33	16735	phocae	phocae	2.436	
34	35224	* gallolyticus	gallolyticus	2.297	
35	18719	peroris	peroris	1.966	
36	18720	infantis	infantis	1.832	
37	15980	porcinus	porcinus	2.017	
38	14545	pneumoniae	pneumoniae	2.366	
39	17755	acidominimus	acidominimus	2.019	
40	14694	agalactiae	agalactiae	2.143	
41	8249	cristatus	cristatus	2.062	
42	20563	anginosus	anginosus	2.252	

43	27297	alactolyticus	alactolyticus	2.042	
44	4207	pyogenes	pyogenes	2.430	
45	12174	parauberis	parauberis	2.267	
46	5636	vestikularis	vestibularis	2.264	
47	25735	sobrinus	sobrinus	2.105	
48	24890	downei	downei	2.320	
49	43577	orisratti	orisratti	2.079	
50	46149	lutetiensis	lutetiensis	2.040	
51	15885	* dysgalactiae	dysgalactiae	2.284	
52	14508	criceti	criceti	2.222	
53	14897	equinus	equinus	2.020	
54	16520	ferus	ferus	2.388	
55	17824	mutans	mutans	2.106	

\*alalaji

## Potilasnäytteistä MALDI-TOF MS:lla, pyrosekvensoinnilla ja Vitek2:lla saadut tulokset

id	Maldin tulos (S.)	arvo	Pyrosekvensoinnin tulos (S.)	Vitekin tulos
93	pneumoniae	2.097	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
195	sanguinis	2.013	sanguinis	S. sanguinis
202	pneumoniae	2.052	(pseudo)pneumoniae	S. pluranimalium
209	anginosus	2.249	anginosus	S. anginosus
225	lutetiensis	2.183	bovis, infantarius ss. coli, lutetiensis	S. sanguinis
310	gallolyticus	2.253	gallolyticus ss. gallolyticus / caprinus	S. gallolyticus
333	pneumoniae	2.034	infantis	S. mitis/oralis
352	pneumoniae	1.916	mitis (v2)	S. mitis/oralis
371	pneumoniae	2.039	infantis	unidentified organism
512	pneumoniae	2.075	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
593	pneumoniae	1.919	oralis	S. mitis/oralis
605	constellatus	2.126	constellatus	S. sanguinis
1019	anginosus	2.205	anginosus	S. anginosus
1343	intermedius	1.903	intermedius	S. intermedius
1530	pneumoniae	1.992	(pseudo)pneumoniae	unidentified organism
1912			sanguinis	S. mitis/oralis
2017	pneumoniae	1.979	sanguinis	S. mitis/oralis
2029	pneumoniae	1.738	oralis	S. mitis/oralis
2075	salivarius	2.270	salivarius/Vestibularis	S. salivarius
2129	gallolyticus	2.245	gallolyticus ss. gallolyticus / caprinus	S. mutans
2227	pneumoniae	2.012	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
2359	pneumoniae	2.000	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
2413	parasanguinis	2.291	oralis (v1)	S. parasanguinis
2743			infantis	S. mitis/oralis
2790	oralis	1.854	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
2803	pneumoniae	2.100	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
2805	parasanguinis	2.082	oralis (v1)	S. parasanguinis
2855	pneumoniae	2.051	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
2919	pneumoniae	2.147	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
3002	pneumoniae	2.064	mitis	S. mitis/oralis
3027	pneumoniae	2.051	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
3056	pneumoniae	2.131	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
3113	anginosus	2.049	anginosus	S. anginosus
3130	pneumoniae	2.057	mitis (v2)	S. mitis/oralis
3206			sanguinis	S. mitis/oralis
3263	pneumoniae	2.113	infantis	S. mitis/oralis
3376	pneumoniae	2.086	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
3387	anginosus	2.236	anginosus	S. anginosus
3403	pneumoniae	2.022	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
3446	gordonii	2.066	gordonii	S. gordonii
3486	pneumoniae	2.110	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis

3731	pneumoniae	2.075	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
3790	pneumoniae	1.943	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
3792	constellatus	2.162	constellatus	inconclusive identification
3981	pneumoniae	1.982	peroris	S. mitis/oralis
4015	anginosus	2.120	anginosus	S. anginosus
4018	sanguinis	2.014	sanguinis	S. sanguinis
4168	pneumoniae	1.864	sanguinis	S. mitis/oralis
4204	pneumoniae	2.004	(pseudo)pneumoniae	unidentified organism
4291	pneumoniae	2.183	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
4305	capitis	2.297	anginosus	inconclusive identification
4387	pneumoniae	1.786	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
4442	pneumoniae	1.924	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
4581	salivarius	2.004	salivarius/Vestibularis	S. salivarius
4627	sanguinis	2.008	sanguinis	S. sanguinis
5011	anginosus	2.228	anginosus	S. anginosus
5013	salivarius	1.881	salivarius/Vestibularis	S. salivarius
5115	oralis	1.808	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
5224	oralis	1.854	sanguinis	S. mitis/oralis
5237	sanguinis	2.171	sanguinis	S. sanguinis
5344	salivarius	2.182	salivarius/Vestibularis	S. infantarius
5360	pneumoniae	1.782	sanguinis	S. mitis/oralis
5380	anginosus	1.977	intermedius	S. intermedius
5643	anginosus	1.979	intermedius	S. intermedius
5664	sanguinis	2.042	sanguinis	S. sanguinis
5690	constellatus	2.271	constellatus	inconclusive identification
5691	constellatus	2.168	constellatus	S. constellatus ss constellatus
6185	equinus	2.158	bovis, infantarius ss. coli, lutetiensis	S. infantarius
6194	anginosus	1.920	intermedius	S. intermedius
6202	sanguinis	2.046	sanguinis	S. sanguinis
6301	pneumoniae	1.942	mitis	S. mitis/oralis
6418	anginosus	1.897	intermedius	S. intermedius
6453	vastibularis	2.024	salivarius/Vestibularis	unidentified organism
6565			sanguinis	S. mitis/oralis
6584	pneumoniae	2.077	oralis	S. mitis/oralis
6673	gordonii	2.000	gordonii	S. gordonii
6765	salivarius	2.138	salivarius/Vestibularis	S. salivarius
6772	pneumoniae	2.119	mitis	S. mitis/oralis
6819	constellatus	2.231	constellatus	S. constellatus ssp constellatus
6893	pneumoniae	2.015	mitis	S. mitis/oralis
7096	sanguinis	2.060	sanguinis	S. sanguinis
7097	sanguinis	2.070	sanguinis	S. sanguinis
7121	oralis	2.043	(pseudo)pneumoniae	S. mitis/oralis
7404	micrococcus luteus	2.126	intermedius	S. constellatus ssp pharyngis

7441	pneumoniae	2.241	(pseudo)pneumoniae	unidentified organism
7448	epidermidis	1.985	salivarius/Vestibularis	Staph. intermedius
7561	anginosus	2.296	anginosus	S. Anginosus
7696	oralis	1.826	sanguinis	S. mitis/oralis
7720	pneumoniae	2.253	(pseudo)pneumoniae	unidentified organism
7765	anginosus	2.094	anginosus	S. anginosus
7864	gallolyticus	2.104	gallolyticus ss. pasteurianus	S. pasteurianus
7937	oralis	1.965	infantis	S. mitis/oralis
7949	salivarius	2.278	salivarius/Vestibularis	S. salivarius
8029	pneumoniae	2.174	sanguinis	S. mitis/oralis
8072	sanguinis	2.042	sanguinis	S. sanguinis
8073	anginosus	2.213	anginosus	S. Anginosus
8106	equinus	1.937	bovis, infantarius ss. coli, lutetiensis	S. infantarius
8170	equinus	2.015	bovis, infantarius ss. coli, lutetiensis	S. infantarius
8197	pneumoniae	2.162	infantis	S. mitis/oralis